

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Efecto de la suplementación de L-Glutamina sobre la
expresión de genes de la respuesta inmune humoral de la
mucosa intestinal de las crías de alpacas (*Vicugna pacas*)**

TESIS

Para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Emanuel Domingo Bejarano Lira

Lima – Perú

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 177-EAPMV/FMV-2015

PRESIDENTE :

RAÚL ROSADIO ALCÁNTARA

MIEMBROS :

ALBERTO MANCHEGO SAYÁN
Asesor de la Tesis

JUAN OLAZÁBAL LOAIZA

MERCY RAMÍREZ VELÁSQUEZ

San Borja, 16 de diciembre de 2015

V° B°

MV. Mg. HERMELINDA RIVERA GERÓNIMO
Directora de la Escuela Académico Profesional de
Medicina Veterinaria





UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA)
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **miércoles 16 de diciembre de 2015**, a las **12:00 horas**, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **177-EAPMV/FMV-2015**, integrado por los siguientes profesores:

RAÚL ROSADIO ALCÁNTARA	Presidente del Jurado
ALBERTO MANCHEGO SAYÁN	Asesor de la Tesis
JUAN OLAZÁBAL LOAIZA	Miembro del Jurado
MERCY RAMÍREZ VELÁSQUEZ	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **BEJARANO LIRA, EMANUEL DOMINGO**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

"EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE L-GLUTAMINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL DE LA MUCOSA INTESTINAL DE LAS CRIAS DE ALPACAS (*Vicugna pacos*)"

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:20 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

.....
Raúl Rosadio Alcántara: PhD. Prof. Principal, T.C.

.....
Alberto Manchego Sayán: Mg. Prof. Principal, D.E.

.....
Juan Olazábal Loaiza: Mg. Prof. Asociado, T.C.

.....
Mercy Ramírez Velásquez: Mg. Prof. Auxiliar, D.E.



DEDICATORIA

Al Dios de Jacob, por el cumplimiento de su promesa ayudándome a terminar mi carrera y a mis padres por acompañarme en cada paso de mi vida. Héctor, sé que desde el Cielo se cumple tu deseo de ver a tu hijo profesional. Los Amo!!!

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su infinita misericordia acompañándome en todo momento de mi vida. Sin Él no lo hubiera logrado. Gracias Padre Amado!.

A Héctor(Q.E.P.D.) y Otilia por su dedicación y entrega como padres. A mis hermanos: Yesenia, Héctor y Marisol, por su apoyo en toda etapa de mi vida. Los amo!!!

Al Dr. Alberto Manchego Sayán, por su apoyo incondicional y a su señora esposa la Dra Nieves Sandoval por sus consejos y buenos deseos.

A Gina, Cesar, Raquel, Joan, Ana, compañeros de Laboratorio con quienes compartí este tiempo, gracias muchachos.

A mi casa de estudios FMV-UNMSM la que llevaré siempre en mi corazón y al centro de crianza de alpacas de La Raya (IVITA Maranganí) y a las comunidades alpaqueras del distrito de Maranganí, provincia de Canchis, Cusco, por su colaboración.

Al Fondo Nacional de Innovación en Ciencia y Tecnología (FINCyT-PIBAP 2013), Contrato N° 180-2013 por el financiamiento de esta tesis.

A mi esposa Yuli, gracias mi amor por todo tu apoyo. Te amo y estoy feliz de tenerte conmigo otra vez y esta vez para siempre.

RESUMEN

En el presente estudio se determinó el efecto de la L-glutamina sobre la expresión de la inmunoglobulina A (IgA), TGF- β , IL-4, IL5, IL-6 e IL-10 en la mucosa del yeyuno de las crías de alpaca. Se formaron 2 grupos: uno de 6 crías (grupo A) y el segundo de 7 crías (grupo B) de 3 a 7 días de edad. Al primer grupo (A) se le administró 3.3mM de L-glutamina por kg peso vivo, vía oral; y se repitió a los 7 días post primera dosificación. Al segundo grupo (B), se le suministró Buffer Fosfato Salino o PBS (del inglés phosphate buffered saline) vía oral como control. Tres días después, una porción de yeyuno de cada cría fue procesada para la extracción de ARN mensajero (ARNm) y realizado la transcripción reversa (RT) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR tiempo real por sus siglas en inglés (polymerase chain reaction) utilizando cebadores específicos. Para la cuantificación relativa de la IgA e interleucinas se usó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se determinó que en las crías tratadas con L-glutamina, el TGF- β se expresó 3 veces más ($p<0.05$), y la IgA 18 veces más ($p<0.05$) que en los controles. Las expresiones de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 tuvieron estadísticamente los mismos niveles en los animales tratados y los controles. Se concluye que la L-glutamina incrementa la expresión TGF β e IgA mejorando la respuesta inmune adaptativa humoral de mucosa intestinal en crías de alpaca.

Palabras clave: Inmunidad de mucosas, crías de alpacas, Inmunoglobulina A, interleucinas.

ABSTRACT

In the present study the effect of L-glutamine on expression of immunoglobulin A (IgA), TGF- β , IL-4, IL5, IL-6 and IL-10 is determined in the jejunal mucosa baby alpaca. Two groups were formed: the first group of 6 baby's alpaca was given 3.3mM of L-glutamine per kg body weight, orally; and he repeated at 7 days post first dose. The second group (control) of 7 baby's alpaca will be supplied phosphate buffered saline o PBS. Three days later, a portion of each breeding jejunum were processed for extracting messenger RNA (mRNA) and performing the reverse transcription (RT) and real time polymerase chain reaction o PCR using specific primers. For relative quantitation of IgA and interleukins $2^{-\Delta\Delta ct}$ Method was used. It was determined that in cells treated with L-glutamine offspring, TGF- β was expressed 3 times ($p<0.05$), and 18 times IgA ($p<0.05$) than controls. Expressions of IL-4, IL-5, IL-6 and IL-10 were statistically the same levels in the treated animals and controls. It is concluded that L-glutamine increases expression of IgA and TGF- β improving humoral adaptive immune response of intestinal mucosa in baby alpaca.

Key words: Baby Alpaca, Immunoglobulin A, mucosae immunity, Interleukin.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE GENERAL	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE ANEXOS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. L – glutamina	2
2.1.1. Modulación de la función inmune	6
2.1.1.1. Producción de citoquinas	7
2.1.1.2. Estallido respiratorio	8
2.1.2. Avances en el estudio de la glutamina	9
2.2. La alpaca	9
2.3. Respuesta inmune	10
2.4. Citoquinas	12
2.5. Inmunidad humoral	14
2.5.1. Interleucina 4 (IL-4)	16
2.5.2. Interleucina 5 (IL-5)	16
2.5.3. Interleucina 6 (IL-6)	17
2.5.4. Interleucina 10 (IL-10)	17
2.5.5. Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)	18
2.6. Inmunidad de mucosas	19
2.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
2.7.1. Pasos	23
2.7.1.1. Desnaturalización	23

2.7.1.2.	Alineamiento (annealing) o hibridación	23
2.7.1.3.	Extensión	23
2.7.2.	Componentes de la PCR	24
2.7.2.1.	Muestra (ADN)	24
2.7.2.2.	Cebadores o iniciadores (primers)	24
2.7.2.3.	Cloruro de magnesio	24
2.7.2.4.	Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs)	24
2.7.2.5.	Enzima	25
2.8	PCR con transcripción reversa en tiempo real (qRT-PCR)	25
2.8.1.	Componentes de la qRT-PCR	26
2.8.1.1.	Aislamiento de ARN	26
2.8.1.2.	Transcripción reversa	26
2.8.2.	Marcadores fluorescentes	27
2.8.2.1.	Genéricos	27
2.8.2.2.	Específicos	27
2.9.	Cuantificación relativa	28
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1.	Lugar de estudio	29
3.2.	Obtención y procesamiento de muestras	29
3.3.	Extracción de ARN total	30
3.4.	Síntesis de ADN complementario por transcripción inversa (RT)	31
3.5.	PCR en tiempo real	32
3.6.	Cuantificación relativa	34
3.7.	Análisis estadístico	34
IV.	RESULTADOS	35
V.	DISCUSIÓN	38
VI.	CONCLUSIONES	41
VII.	RECOMENDACIONES	42
VIII.	BIBLIOGRAFÍA CITADA	43
IX.	APÉNDICE	53

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Metabolismo interorgánico de aminoácidos de cadena ramificada, glutamina y arginina y su papel en la función inmune.	3
Figura. 2. Representación esquemática de las funciones celulares reguladas por la glutamina, y los cambios correspondientes en la expresión genética y activación de proteínas (moléculas diana).	5
Figura. 3. Regulación de la función de células T CD4+ por el transportador de aminoácidos mediado por ASCT2.	7
Figura 4.- Cuantificación relativa de las interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y TGF- β en la mucosa intestinal del yeyuno en crías de alpaca tratadas con L-glutamina oral y controles (con PBS).	36
Figura 5.- Expresión de IgA en crías de alpaca tratadas con L-glutamina en comparación con los controles.	37

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: cebadores utilizados en el estudio.	33
Tabla 2: Cuantificación relativa de la expresión de los genes en estudio en la mucosa yeyunal de crías de alpaca tratadas con L-glutamina.	36

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Apéndice I: Cuantificación Relativa IL-4	54
Apéndice II: Cuantificación Relativa IL-5	55
Apéndice III: Cuantificación Relativa IL6	56
Apéndice IV: Cuantificación Relativa IL-10	57
Apéndice V: Cuantificación Relativa TGF- β	58
Apéndice VI : Cuantificación Relativa IgA	59
Apéndice VII: Análisis estadísticos de citoquinas	
Anexo 1. Estadística IL-4	60
Anexo 2. Estadística IL-5	61
Anexo 3. Estadística IL-6	62
Anexo 4. Estadística IL-10	63
Anexo 5. Estadística Ig A	64
Anexo 6. Estadística TGF-β	65

I. INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo post natal, la alpaca debe desarrollar un sistema inmune eficiente para soportar el desafío de microorganismos patógenos que existen en su entorno. En este proceso, la inmunidad de mucosas juega un rol importante para mantener saludable a la cría debido a que a en esta etapa el sistema inmune empieza a reconocer las moléculas extrañas que le permiten activar los mecanismos de la inmunidad innata y la adquirida para brindar una eficiente protección. Debido a que en el intestino se empieza a colonizar con grandes cantidades de microorganismos entre saprófitos y potencialmente patógenos que forman la microflora intestinal, originando continuas señalizaciones para la respuesta inmune, elemento que permite a la vez el desarrollo de todo el sistema inmune de mucosas incluyendo la proliferación de células linfoides diferenciadas para la producción de la expresión de diversas citoquinas e interleucinas que dirigen la respuesta inmune. Por eso en esta etapa existe una gran necesidad de nutrientes y moléculas que permitan la integridad, crecimiento y función de diversas células, tanto epiteliales (enterocitos) como del sistema inmune (células presentadoras de antígenos y subpoblaciones de linfocitos). Además, estas células son altamente degradadoras de glutamina, conteniendo las enzimas necesarias para metabolizarlas. Por lo que puede apoyar su necesidad energética agregando L-glutamina, como se ha determinado en ratones y cerdo, en donde se observa un incremento de la respuesta inmune y protección contra infecciones de patógenos e incremento de índices productivos en el cerdo. Este trabajo tiene como objetivo establecer el efecto positivo de la L-glutamina en el desarrollo de la respuesta inmune humoral de la mucosa intestinal de las crías de alpacas, proyectándose su uso en forma rutinaria en esta etapa de crianza de las alpacas para evitar las pérdidas de las crías por causa infecciosa.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. L - glutamina

En los últimos años se ha observado que los aminoácidos (AA) no son solamente moléculas de señalización celular, sino también, reguladores de expresión génica y de cascadas de fosforilación proteica. Asimismo, los AA son precursores clave de la síntesis de hormonas y sustancias nitrogenadas de bajo peso molecular de gran importancia biológica. Concentraciones fisiológicas de AA y sus metabolitos (por ejemplo, óxido nítrico, poliaminas, glutatión, taurina, hormonas tiroideas y serotonina) son requeridos para sus funciones. Sin embargo, niveles elevados de AA y sus productos (por ejemplo, amoníaco, homocisteína y la dimetilarginina asimétrica) son factores patogénicos para desórdenes neurológicos, estrés oxidativo y enfermedad cardiovascular (Wu, 2009). Algunos aminoácidos regulan las vías metabólicas clave que son necesarias para el mantenimiento, crecimiento, reproducción e inmunidad. Éstos son llamados aminoácidos funcionales los que incluyen a arginina, cisteína, glutamina, leucina, prolina y triptófano (Wu, 2009).

Muchos aminoácidos no esenciales (NEAA, non essential amino acid) incluyendo glutamina, glutamato y aspartato, son oxidados en grandes cantidades por los enterocitos del intestino delgado de mamíferos. Los productos nitrogenados incluyen ornitina, citrulina, arginina y alanina. El intestino delgado utiliza glutamina de la circulación arterial y del lumen intestinal, pero toma el glutamato y el aspartato sólo del lumen intestinal. La glutamina circulante es sintetizada por aminoácidos de cadena ramificada (BCAA, branched-chain AA) y ketoglutarato alfa (derivado principalmente de la glucosa) en el músculo esquelético, tejido adiposo, corazón y placenta (Curthoys y Watford, 1995; Self *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007; Wu, 2009) (Fig. 1).

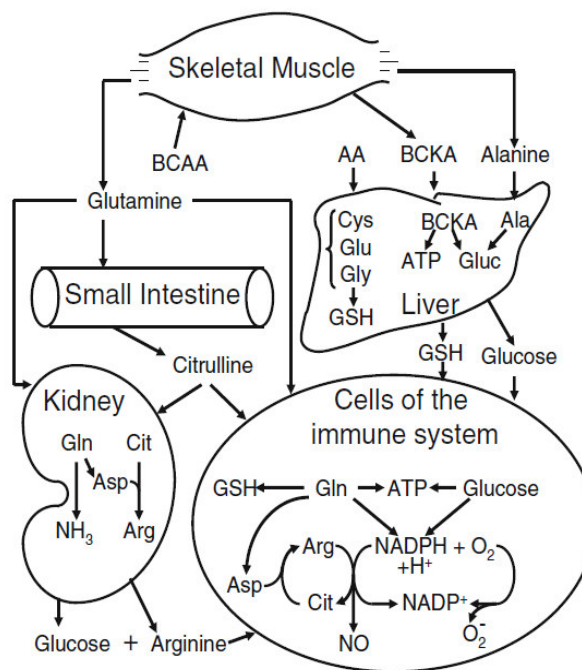


Fig. 1. Metabolismo interorgánico de aminoácidos de cadena ramificada, glutamina y arginina y su papel en la función inmune. El músculo esquelético toma BCAA de la sangre arterial, sintetiza alanina y glutamina a partir de BCAA y α -ketoglutarato, y los libera en la circulación. El intestino delgado utiliza la glutamina para sintetizar citrulina, la que es convertida en arginina en los riñones, células del sistema inmune y otros tipos celulares. El hígado es el órgano primario para la síntesis de glutatión a partir de glutamato, glicina y cisteína, y de glucosa a partir de alanina para uso de células extrahepáticas (incluyendo inmunocitos) y tejidos. Arg: arginina, Asp: aspartato, Cit: citrulina, BCKA: branched-chain α -ketoacids, Gluc: glucosa, GSH: glutatión. Tomado de Li *et al.* (2007).

La L-glutamina (Gln) es un aminoácido no esencial abundante en fluidos fisiológicos (plasma, citoplasma, leche, fluidos fetales) (Li *et al.*, 2007) y es un regulador crucial de la expresión génica. Adicionalmente, la Gln puede regular las vías de señalización celular a través de la vía de la rapamacina, la proteína kinasa activada del monofosfato de adenosina, la kinasa relacionada a la señalización extracelular, la kinasa Jun, la proteína kinasa activada de mitógeno y el óxido nítrico (Rhoads y Wu, 2009; Rezaei *et al.*, 2013). Su principal fuente es el músculo esquelético desde donde es liberado hacia el torrente sanguíneo y transportado a una variedad de tejidos. Las concentraciones

intracelulares varían entre 2 y 20 mM (dependiendo del tipo celular) mientras que la concentración extracelular es de 0.7 mM en promedio (Newsholme *et al.*, 2003).

La glutamina presenta un papel importante al promover y mantener la función de varios órganos y células como el riñón (Conjard *et al.*, 2002), intestino (Ramos Lima *et al.*, 2002), hígado (de Souza *et al.*, 2001), corazón (Khogali *et al.*, 2002), neuronas (Mates *et al.*, 2002), linfocitos (Curi *et al.*, 1986, 1999), macrófagos (Newsholme *et al.*, 1986), neutrófilos (Pithon-Curi *et al.*, 2002a, 2003b; Pithon-Curi *et al.*, 2003), células beta del páncreas (Skelly *et al.*, 1998) y adipocitos (Kowalchuk *et al.*, 1988). Al más básico nivel, la glutamina sirve como un combustible importante en estas células y tejidos. Una tasa alta de absorción de glutamina es característica de las células de división rápida como los enterocitos, fibroblastos y linfocitos (Curi *et al.*, 1999) donde la glutamina es un precursor importante de péptidos y proteínas, así como de aminoazúcares, purinas, pirimidinas al participar en la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos (Szondy y Newsholme, 1989, 1990; Boza *et al.*, 2000) (Fig. 2).

La integración de las redes reguladoras dependientes de glutamina tiene profundos efectos sobre la proliferación celular debido a que constituye el principal sustrato energético para las células de división rápida (incluyendo eritrocitos, linfocitos enfrentados inmunológicamente y macrófagos activados) al proveer ATP para el recambio proteico intracelular, transporte de nutrientes a través de la membrana plasmática, crecimiento celular y migración, así como también en el mantenimiento de la integridad celular (Curi *et al.*, 2005). Además, la L-glutamina es un precursor de la síntesis de purinas y pirimidinas, necesarias para la proliferación celular en células embrionarias, trofoblastos, linfocitos intraepiteliales y células de la mucosa (Wu *et al.*, 2011), así como también de ornitina, citrulina, arginina, prolina y asparaginas, reservorio de nitrógeno y síntesis de NADP (Wu, 2009).

2.1.1. Modulación de la función inmune

Los linfocitos T son efectores centrales del sistema inmune adaptativo, y su función es crucial para mediar las respuestas inmunes de larga duración hacia patógenos. Tras la activación antigénica, las células T CD4⁺ inocentes se expanden y diferencian en poblaciones de células T específicas, incluyendo Th1, Th2 y Th17, cada una con una función efectora específica hacia el patógeno dado. Uno de los programas fundamentales que dirigen la activación de células T es la regulación del metabolismo celular, las series de reacciones bioquímicas que median la producción de energía celular y biosíntesis. El programa metabólico predominante de células T CD4⁺ activadas es un cambio a la glicólisis aeróbica, también conocido como efecto Warburg, un programa metabólico pro-crecimiento que genera ATP y macromoléculas requeridas para la proliferación de células T (Poffenberger y Jones, 2014).

Los aminoácidos son nutrientes esenciales para las células T porque sirven como fuente de combustible y precursores biosintéticos para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. De éstos, el NEAA glutamina es el de mayor relevancia. Nakaya et al. (2014) demostraron que el sistema transportador 2 de AA (ASCT2, alanina, serina y cisteína (ASC) system AA transporter 2) alanina, serina y cisteína (ASC) es un regulador crucial para la toma de glutamina dentro de las células T CD4⁺ e influye en el desarrollo de las respuestas proinflamatorias mediadas por Th1 y Th17 in vitro e in vivo.

ASCT2 es un transportador de amino ácido neutral dependiente de sodio, codificado por SLC1A5 que media el cotransporte de sodio con glutamina (u otros aminoácidos neutrales como alanina, cisteína, serina y treonina) con gran afinidad (Fig. 3) (Poffenberger y Jones, 2014).

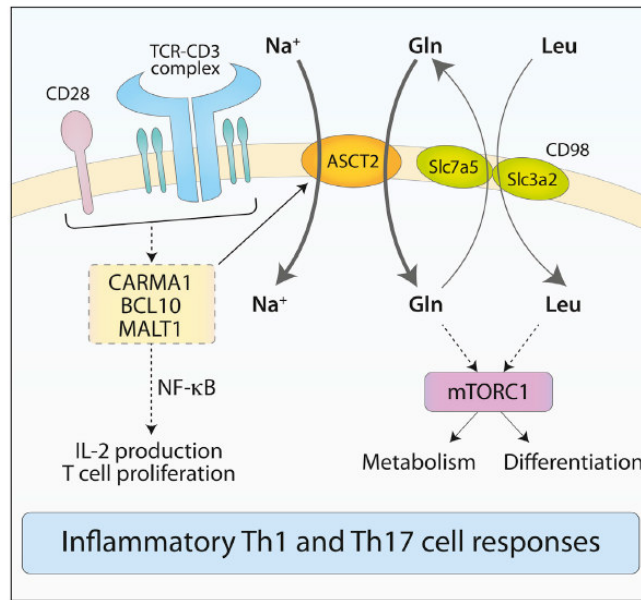


Fig. 3. Regulación de la función de células T CD4+ por el transportador de aminoácidos mediado por ASCT2. La glutamina (Gln) dependiente del TCR importada por ASCT2 promueve el desarrollo de respuestas proinflamatorias Th1 y Th17. ASCT2 cotransporta Na⁺ y Gln extracelular, Gln es usada para importar leucina (Leu) vía el transportador Slc7a5-Slc3a2. El complejo Slc7a5-Slc3a2 es conocido también como CD98. Leu promueve la activación de mTORC1, el cual regula el metabolismo y la diferenciación de las células Th1 y Th17. La glutamina también ejerce efectos sobre la activación de mTORC1 a través de mecanismos indirectos. La expresión de ASCT2 es regulada debajo del TCR y la señalización CD28 por el complejo CARMA1-BCL10-MALT1 (CBM). En ausencia de ASCT2, la toma de Gln y Leu por las células T CD4+ es reducida, lo que conduce a la actividad reducida de mTORC1 y respuestas atenuadas de células T CD4+ Th1 y Th17. La proliferación de células T y la producción de IL-2 no se ven afectadas en células T Asct2^{-/-}. Tomado de Poffenberger y Jones (2014).

Debido a que la glutamina es un precursor esencial para la síntesis de purinas y pirimidinas, es requerida para la proliferación de linfocitos. El incremento de concentraciones extracelulares de glutamina de 0.01 a 0.5 mM (nivel fisiológico en plasma) incrementa la proliferación linfocitaria (Wu et al., 1992). Existe evidencia también de que la glutamina es requerida para la síntesis de NO en macrófagos y monocitos vía síntesis de arginina. En efecto, la arginina derivada de glutamina parece ser esencial para la actividad de los macrófagos (Muphy y Newsholme, 1998).

2.1.1.1. Producción de citoquinas

La glutamina es conocida por modular la función inmune celular y la producción de citoquinas in vivo e in vitro. Se ha observado un requerimiento por glutamina para la

expresión de los marcadores de superficie linfocíticos CD25, CD45RO, CD71 y para la producción de IFN- γ y TNF- α (Roth et al., 2002). La expresión y producción de TNF- α por células mononucleares cultivadas estimuladas por lipopolisacárido (LPS) puede ser suprimida por glutamina (2-10 mM) (Pithon-Curi et al., 2002; Wischmeyer et al., 2003). Contariamente, se observó un incremento de síntesis y secreción de IL-1 β e IL-6 en los macrófagos peritoneales de ratas estimulados por LPS (Yassad et al., 2000).

2.1.1.2. Estallido respiratorio

El anión superóxido (O₂⁻) generado por la oxidasa NADPH sirve como el punto de partida para la producción de radicales libres y oxígeno. Estos oxidantes son usados por los neutrófilos para eliminar microorganismos invasivos, sin embargo, sólo causan daño en los tejidos cercanos. Por lo tanto, la producción de oxidantes tiene que ser regulada a fin de asegurar que sólo se generen cuando y donde son requeridos. La glutamina incrementa la generación del anión superóxido estimulado por PMA (miristato acetato de forbol) en neutrófilos de ratas desprovistos de glutamina por 3 horas (Pithon-Curi et al., 2002a). Como principal fuente de glutamato, la glutamina regula la síntesis de glutatión, un tripéptido crucial para defender a las células del estrés oxidativo (Wu et al., 2004).

El intestino y el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, gut-associated lymphoid tissue) son componentes esenciales de la defensa intestinal, confieren protección contra patógenos y antígenos, y promueven la tolerancia frente a bacterias comensales y antígenos dietéticos. Diversos estudios basados en la suplementación oral y parenteral de alimentos han establecido evidencia convincente que no sólo la ingesta proteica total, sino la disponibilidad de aminoácidos dietéticos específicos, particularmente de glutamina, glutamato, arginina, metionina, cisteína y treonina son esenciales para la optimización de la función inmune del intestino y de las células inmunes residentes próximas. Estos aminoácidos promueven el mantenimiento de la integridad, crecimiento y función intestinal, así como también la normalización de la secreción de citoquinas inflamatorias y refuerzan el número de linfocitos T, funciones específicas de células T y la secreción de IgA por las células de la lámina propia (Ruth y Field, 2013).

2.1.2. Avances en el estudio de la glutamina

La suplementación oral de Gln incrementa la concentración plasmática de Gln, disminuyendo la incidencia de diarrea en lechones y evidenciándose un incremento en altura y peso de las vellosidades intestinales del yeyuno e íleon. Los mecanismos protectores de la Gln a nivel intestinal pueden estar asociados al incremento de la expresión de Hsp70 (Zhong et al., 2011). Asimismo, se ha observado una mitigación en el crecimiento de *E. coli* K88+ en cerdos desafiados con esta cepa bacteriana, principalmente debido al mantenimiento de la integridad de la función y morfología intestinal (Yi et al., 2005). De forma similar, la administración de glutamina en la dieta de lechones reforzó la capacidad de defensa oxidativa intestinal al incrementar la concentración de glutatión, previno la atrofia yeyunal y promovió el crecimiento intestinal y ganancia de peso en lechones destetados (Wang et al., 2008).

La suplementación dietética con glutamina al 1% mantiene la salud intestinal y previene la disfunción intestinal en lechones de bajo peso al nacimiento o en aquellos destetados a temprana edad. Asimismo, refuerza la producción láctea en marranas. En consecuencia, cantidades adecuadas de glutamina en la dieta, como nutriente principal, son necesarias para un óptimo crecimiento, desarrollo y desempeño productivo de los cerdos (Wu et al., 2011). Mientras que, el suministro de L-glutamina 1% y L-arginina 0.5% en conejos destetados de 25 días de edad, se ha observado una reducción de la mortalidad durante las dos primeras semanas de edad ($p=0.023$) debido a la reducción de la colonización intestinal por *Eimeria* spp. y *Clostridium* spp. a nivel del íleon, y de *Helicobacter* spp. a nivel del íleon y ciego, y durante el periodo de engorde ($p=0.039$) (Chamorro et al., 2010).

2.2. La alpaca

Las alpacas son miembros de la familia Camelidae, suborden Tylopoda, orden Artiodactyla, clase Mamífero. Los animales de la familia Camelidae son importantes en la puna de los Andes de Sudamérica y en el desierto extremadamente árido de Gobi, donde juegan un rol importante en la vida de los pobladores. Los camélidos en general

son rústicos y menos susceptibles a infecciones que afectan a otro tipo de ganado como la brucelosis y la tripanosomiasis. También ha podido detectarse el virus de Aftosa, aunque no se han reportado casos naturales de la enfermedad. Recientemente, se ha clonado una gran variedad de citoquinas en especies de interés veterinario como la llama (*Lama pacos*) (Odbileg et al., 2006).

Estudios hechos a través de ADN mitocondrial y microsatélites han sugerido fuertemente la descendencia de las alpacas (*Vicugna pacos*) a partir de las vicuñas (*Vicugna vicugna*). Tanto el guanaco como la vicuña parecen haber descendido de un ancestro común y sufrieron divergencia hace alrededor de 2 millones de años; por su parte, las alpacas pudieron haberse separado de las vicuñas hace unos 6 o 7 mil años (Kadwell y et al., 2001).

2.3. Respuesta inmune

La inmunidad innata es una parte evolutivamente antigua de los mecanismos de defensa del huésped es así que, los mismos módulos moleculares se encuentran tanto en plantas como en animales, lo que significa que surgieron antes de la división en estos dos reinos (Janeway y Medzhitov, 2002; Staros, 2005). En contraste, la inmunidad adaptativa es un mecanismo tardío evolutivo desarrollado plenamente sólo en los vertebrados superiores (Ganz, 2003). Mientras que la respuesta inmune adquirida requiere de días o semanas para alcanzar su máxima eficacia, la respuesta inmune innata es esencialmente instantánea (Kimbrell y Beutler, 2001) y es capaz de defender al organismo de agentes patógenos sin necesidad de una exposición previa a ellos (Mannon, 2005).

Los mamíferos superiores interactúan constantemente con agentes microbianos que pueden afectar su desarrollo, causando enfermedad, ya sea directamente dañando el tejido, o indirectamente a través de la inducción de respuestas inflamatorias (Pamer, 2007). El sistema inmune es la responsable de limitar el acceso de estos microorganismos a los tejidos del huésped. La respuesta inmune comprende una serie de mecanismos sucesivos y dependientes uno de otro que se inician luego de la invasión

del patógeno, y están clasificados en respuesta inmune innata y adquirida. La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa frente a las infecciones mediado principalmente por mecanismos rápidos e inespecíficos. La respuesta inmune adquirida es la encargada de la eliminación de patógenos en la fase tardía de la infección, siendo por lo tanto un mecanismo altamente específico (Akira et al., 2006).

Dentro de los medios de la inmunidad innata para la eliminación de patógenos se encuentran las barreras físicas, químicas y celulares. Entre las barreras físicas se encuentran la superficie epitelial, las secreciones, etc.; entre las barreras químicas tenemos a las enzimas como componentes principales y a los péptidos antimicrobianos; y las células dendríticas y macrófagos dentro de las barreras celulares (Janeway et al., 2001). La respuesta inflamatoria es parte del mecanismo de respuesta inmune innato, ya que involucra eventos de vasodilatación, migración de leucocitos a la zona afectada y fagocitosis del agente (Burmester, 2003).

Luego de la respuesta inmune innata, el organismo debe desencadenar una respuesta específica. El sistema inmune adquirido o también denominado adaptativo posee recursos más específicos como los linfocitos T y B, los cuales median la eliminación de patógenos a través del desencadenamiento de vías de respuesta celulares y/o humorales, originando además memoria inmunológica (Goldsby et al, 2002; Burmester, 2003).

Los linfocitos Th1 (T auxiliares 1) y Th2 (T auxiliares 2) existen en las diferentes especies mamíferas. Todos los linfocitos Th provienen de una estirpe celular nativa como los linfocitos Th0, las cuales se pueden diferenciar en linfocitos activados Th1 o Th2. Estos tipos de linfocitos Th0 tienen un perfil de citoquinas intermedio entre los dos subgrupos de linfocitos Th1 y Th2, es decir, que estos pueden secretar tanto citoquinas de la respuesta inmune humoral y celular. Evidencias al respecto, demuestra la existencia de un subgrupo adicional, denominado Th3, el cual está implicado en la secreción de TGF- β , y está asociado con la regulación de la respuesta inmune de mucosas (Xin et al., 2007).

Se han realizado estudios en la inmunidad innata (Bardález et al., 2013; More et al., 2011; Tambillo et al., 2013) y adquirida en la alpaca para evaluar los perfiles de

citoquinas correspondientes a respuestas Th1 y Th2 in vivo (Chiok, 2012; More, 2013) e in vitro (More, 2013; Watanabe et al., 2014).

2.4. Citoquinas

La adecuada respuesta inmune implica una interacción compleja entre las células linfoides, células inflamatorias y hematopoyéticas. Esta interacción es llevada a cabo por un grupo de proteínas denominadas citoquinas, nombre que define la actividad que cumplen en la comunicación célula-célula. Las citoquinas se unen a receptores celulares que se encuentran en la superficie de sus células blanco, lo que desencadena la expresión genética. Dependiendo de la localización y cercanía de los blancos celulares, éstas citoquinas tendrán efectos autocrino, cuando ejercen su efecto en la misma célula que lo secretó; paracrino, cuando su efecto se realiza en blancos cercanos; y endocrinas, cuando sus blancos se localizan en otras zonas lejanas al lugar de secreción. Las citoquinas son las principales reguladoras de la intensidad y duración de la respuesta inmune por activar o inhibir la activación, proliferación y diferenciación de varias poblaciones celulares y/o por regular la producción de anticuerpos u otras citoquinas.

A principios de la década de 1980 las citoquinas fueron caracterizadas como moléculas de comunicación entre las células del sistema inmune y las células endoteliales (Pasic et al., 2003). Posteriormente las citoquinas se definieron como pequeñas moléculas de péptidos secretadas por las células de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa que median muchas de las funciones de estas células, regulando así la respuesta inmune e inflamatoria. (Pié et al, 2004; Abbas et al., 2008).

Se hablaba de linfocinas, monocinas o interleucinas según fuesen producidas por los linfocitos, los monocitos macrófagos o los leucocitos polimorfonucleares. Estudios posteriores determinaron que tales sustancias eran producidas por diferentes tipos celulares del sistema inmune (macrófagos, linfocitos T, NK) pero también por células no inmunes (células epiteliales, fibroblastos, células endoteliales) por lo que se le dio un nombre más amplio: citoquinas o citocinas. Dentro de este nombre se agrupan: interleucinas, quimioquinas, interferones, factores estimuladores de colonias, factores

de crecimiento, factores de necrosis tumoral y otros (Aguirre et al., 2002; Pié et al., 2004)

Las citoquinas o quimiocinas son proteínas secretadas por ciertas poblaciones celulares que ejercen su efecto sobre otros blancos celulares, uniéndose a receptores específicos localizados en sus membranas celulares. Esta unión permite el desencadenamiento de traducción de señales intracelulares, con la consiguiente activación de factores transcripcionales, los cuales permitirán la expresión de proteínas codificadas en el genoma celular (Janeway et al., 2001). De este modo, las citoquinas actúan como hormonas inmunoregulatoras y/o efectoras, motivo por el cual, juegan un rol importante en la respuesta inmune (Goldsby et al., 2002). Dentro de la respuesta inmune humoral y celular, existen citoquinas que median el desencadenamiento de cada una de estas vías. Una gran cantidad de evidencias señalan diferencias en el patrón de citoquinas dependiendo de la respuesta de células T auxiliares y células T citotóxicas, lo cual está relacionado al tipo de noxa que desencadena el cuadro.

Las citoquinas exhiben diferentes atributos como pleiotropismo, mediante el cual pueden ejercer efecto en diferentes tipos celulares, ejerciendo diferentes efectos; redundancia; cuando dos o más citoquinas tienen las mismas funciones; sinergismo, cuando el efecto combinado de varias citoquinas es mayor que el efecto aditivo de cada uno de ellos; antagonismo, cuando los efectos de una citoquina reducen el efecto de otras. Muchas citoquinas son denominadas interleucinas, para referir el efecto ejercido en la comunicación de los leucocitos, se ha determinado las interleucinas del 1 al 25, sin embargo, está claro que faltan muchos por describir.

En la actualidad se han secuenciado casi la totalidad de los genes descubiertos, logrando determinar la estructura y función de cada una de éstas. Las citoquinas tienen peso molecular menos de 30KDa. Así, las citoquinas están agrupadas en 4 grupos: La familia de las hematopoyetinas, la familia interferón, la familia de las quimiocinas y la familia del factor de necrosis tumoral (Goldsby et al., 2002).

2.5. Inmunidad humoral

El organismo debe montar una respuesta adecuada frente al patógeno específico, por lo tanto, en una infección causada por antígenos extracelulares, la vía de respuesta adecuada es la respuesta inmune humoral, la cual es mediada por anticuerpos. Los anticuerpos son glicoproteínas de superficie de las células B, pero que son secretadas por los plasmocitos, células diferenciadas de los linfocitos B, luego que son estimulados frente al patógeno específico. Estos anticuerpos están dirigidos frente a moléculas altamente antigénicas que se encuentran presentes en la superficie de los patógenos o que forman parte de productos de secreción de los mismos, motivo por el cual, frente a un estímulo antigénico en particular, se puede encontrar una población altamente heterogénea de anticuerpos, los cuales están dirigidos frente a todos los determinantes antigénicos o epítomos. La principal función de los anticuerpos es bloquear la actividad antigénica de estas moléculas, a través de su unión al antígeno, sin embargo, también participan en otras funciones efectoras como la interacción con otras glicoproteínas, células y tejidos que participan también en la respuesta inmune humoral (Tizard, 2009).

Una de las principales actividades efectoras de los anticuerpos en la respuesta inmune humoral es actuar como opsonina. El proceso de opsonización, mecanismo primordial de los anticuerpos, se basa en la unión de anticuerpos sobre la superficie de los antígenos y que facilita la fagocitosis del mismo a través de receptores específicos de las inmunoglobulinas, localizados en la membrana celular de los fagocitos que se unen con un alto grado de avidéz y afinidad a los anticuerpos a través de su fragmento Fc (Goldsby et al., 2002). Así, se inicia una serie de eventos intracelulares de vías de traducción de señales, resultando en la fagocitosis del complejo antígeno-anticuerpo. Posteriormente el patógeno se vuelve blanco de una serie de eventos destructivos para la degradación del agente (Tizard, 2009).

Como es claro, la activación de una respuesta inmune humoral depende básicamente del montaje de una respuesta en base a linfocitos B, y ésta se produce a través de la activación por antígenos solubles, lo cual a su vez requiere la participación de linfocitos T colaboradores. Luego de la captación antigénica, el antígeno es procesado y posteriormente expresado en la superficie celular, proceso denominado presentación

antigénica. El antígeno implicado es así presentado a un tipo linfoide especializado, los linfocitos T colaboradores. Aquí se producen una serie de señales bioquímicas bidireccionales, es decir, que permite la estimulación tanto de los linfocitos T como de los linfocitos B (Abbas et al., 2012).

La respuesta inmune humoral es mediada principalmente por anticuerpos. Este tipo de respuesta, también conocida como una respuesta Th2 (denominada así por el tipo de linfocitos T que la dirigen), son dirigidas por las Interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 9 (IL-9) e interleucina 10 (IL-10) (Spellberg y Edwards, 2001). Estas células Th2 permiten la estimulación de altos títulos de anticuerpos, así las IL-4, 5 y 10, activan la proliferación de linfocitos B, producción de anticuerpos y el cambio de clases de los linfocitos B para expresar otro tipo de inmunoglobulina (“switching” en inglés). En efecto, el “switching” de clases de IgG a IgE no puede ocurrir sin la presencia de IL-4 o IL13. La IL-5 es una potente citoquina hematopoyética que estimula la producción de eosinófilos por la médula ósea, así como la activación y quimiotaxis de eosinófilos y basófilos. IL-4 e IL-10 inhiben la secreción de IL-2 e IFN- γ , bloqueando así la posibilidad de que los linfocitos Th0 puedan polarizarse para el desarrollo de linfocitos Th1. Además, IL-4, IL-10 e IL-13 suprimen la fagocitosis, el estallido oxidativo, la destrucción intracelular e inhibe la presentación de antígenos.

Existen factores que median la polarización de la respuesta Th1 y Th2, como son la producción de citoquinas locales, la presencia de sustancias inmunológicamente activas, la dosis y ruta de administración del antígeno, el tipo y forma de presentación del antígeno, y la “fuerza de la señal” que está relacionado al grado de avidez y afinidad entre el receptor de células T y las moléculas de MHC involucradas. De estos factores la presencia de citoquinas en la zona es la más importante. Así, se considera que la principal citoquina que media la polarización Th2 es la interleucina 4 (Yagi et al., 2002).

2.5.1. Interleucina 4 (IL-4)

La interleucina 4 es una glicoproteína de 20 KDa de peso molecular, originalmente identificada por su actividad de sostener el crecimiento y diferenciación de linfocitos B, sin embargo, ahora se conoce que ejerce múltiples actividades en diferentes tipos celulares. Se ha demostrado que IL-4 participa en el “switching” de clases de IgE e IgG1; y considerándose importante en el desarrollo de linfocitos Th2. Las células productoras de IL-4 son las células NK, basófilos, eosinófilos, mastocitos y las células T CD4; sin embargo, no se ha determinado cuál de éstos es la fuente principal de IL-4 (Xin et al., 2007).

En las superficies mucosas, IL-4 interviene en la producción de mucus y diferenciación de linfocitos B (Davey et al., 2000). También se ha demostrado que IL-4 ejerce un efecto directo sobre el epitelio intestinal, reduciendo la respuesta secretoria de iones, reduciendo la resistencia eléctrica e incrementando la permeabilidad a moléculas de bajo peso molecular (Berin et al., 1999).

2.5.2. Interleucina 5 (IL-5)

La IL-5 es un activador de eosinófilos y sirve de nexo principal entre la activación del linfocito T y la inflamación eosinófila. Es un homodímero de un polipéptido que contiene un dominio de cuatro hélices α , y es miembro de la familia de citoquinas del tipo I. La producen los linfocitos Th2 y los mastocitos activados. El receptor para la IL-5 es un heterodímero compuesto de una cadena α única y una cadena β común (βc), que también forma parte de los receptores para la IL-3 y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). En la principal vía de transmisión de señales inducida por la IL-5 participan JAK2 y STAT3 (Abbas et al., 2012).

Esta glucoproteína homodímera unida por puentes disulfuro de 26 kDa producida por los linfocitos Th2 activados, mastocitos y eosinófilos. En los seres humanos su principal actividad es el control de la producción de eosinófilos (Tizard, 2009), la activación de eosinófilos maduros y estimular el crecimiento y diferenciación de los mismos. Los eosinófilos maduros son capaces de matar a los helmintos, expresan

receptores para el Fc específicos de la IgE y de algunos anticuerpos IgG, y por ello son capaces de unirse a los helmintos opsonizados por los anticuerpos. La IL-5 también estimula la producción de anticuerpos IgA (Abbas et al., 2012).

2.5.3. Interleucina 6 (IL-6)

Glicoproteína de 20 a 30 kDa que se encuentra en al menos 5 isoformas. Se produce por los macrófagos activados, linfocitos T y B, mastocitos, células del endotelio vascular, fibroblastos, queratinocitos y células mesangiales. También se produce por las células musculares durante el ejercicio. Actúa sobre los linfocitos T, linfocitos B, hepatocitos y células del estroma de la médula ósea y del encéfalo (Tizard, 2009). Su producción está estimulada por las endotoxinas bacterianas, la IL-1 y el $\text{TNF}\alpha$. La IL-6 afecta a la inflamación y a la inmunidad adquirida, y el mediador más importante de la reacción de fase aguda y del shock séptico. Por tanto, se ha sugerido que la IL-6 regula la transición del proceso primario de la inflamación llevado a cabo por los neutrófilos a un proceso posterior dominado por macrófagos (Tizard, 2002). El $\text{TNF}\alpha$, IL-1 y la IL-6 producidos en los lugares inflamatorios pueden entrar en la sangre y llegar a la médula ósea, donde potencian la producción de neutrófilos a partir de progenitores de la médula ósea, habitualmente mediante la acción en concierto con el factor estimulante de colonias. De esta forma, estas citoquinas aumentan el aporte de células que pueden reclutarse en los lugares de infección (Abbas et al., 2012).

2.5.4. Interleucina 10 (IL-10)

La interleucina 10 es una citoquina antiinflamatoria considerada como citoquina Th2 que reduce la respuesta alérgica y la respuesta Th1 (Matheu y Barrios, 2004). Si bien es una citoquina antiinflamatoria, aún se desconoce el mecanismo de función exacto. Se ha demostrado que IL-10 inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8 y factor estimulante de colonias granulocitos-monocitos (CSF-GM). Además, IL-10 inhibe la expresión de MHC-II y moléculas coestimuladoras sobre las células presentadoras de antígenos e incrementa la producción de mediadores antiinflamatorios. La IL-10 puede inhibir directamente las respuestas tipo Th1, por la reducción de

producción de citoquinas proinflamatorias, o a través de la inhibición de linfocitos T (Leach et al., 1999).

2.5.5. Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

El factor de crecimiento transformante beta 1, TGF- β 1 ó TGFB1 es una proteína perteneciente a la superfamilia de factores de crecimiento transformante beta de las citoquinas. Es una proteína de secreción que lleva a cabo diversas funciones en la célula, como el control del crecimiento celular, proliferación celular, procesos de diferenciación y apoptosis (Munger et al, 1997).

Las Citocinas TGF β están implicadas en el control de muchos procesos biológicos, incluyendo el desarrollo embrionario, el control del ciclo celular, el crecimiento y la diferenciación celular, y la producción de matriz extracelular, así como el desarrollo y la función de los leucocitos (Letario y Roberts, 1998).

In vitro, el TGF- β 1 puede inhibir la proliferación de células B, la secreción de anticuerpos, y la expresión de moléculas de superficie, incluyendo receptores de antígenos. También estimula la expresión de MHC de clase II e induce la diferenciación de células plasmáticas secretoras de IgA). La inducción mediada por TGF- β de la expresión de IgA implica la movilización del factor de transcripción CBF α 3 (AML2) de unión al promotor de la línea germinal Ig α y transcripción "estéril" del locus, que se sabe que juega un papel crítico en el cambio de clase de inmunoglobulina. (Letterio y Roberts 1998).

Las recombinaciones de variación de clase de las inmunoglobulinas son el resultado de la de sobreposiciones de los genes de la cadena pesadas de una línea germinal y la transcripción de estos transcritos línea germinal (GLT) preceden a la transcripción de los mRNA (RNA mensajeros) productivos. La TGF β 1 induce a la variación e incrementa los transcritos GL α en linfocitos B de ratones, humanos y conejos (Islam et al, 1991), activando a sus receptores y proteínas de su señalización denominadas Smad3 y Smad4 (Massague 1998) y estimulación de Runx3 y p300 e induciendo la transcripción de GL α y secreción de IgA. Se ha determinado que el INF γ inhibe no

solamente la actividad promotora del TGF β sobre la GL α , sino también sobre la producción de IgA bloqueando las proteínas Smad3 y p300 (Park et al, 2000).

El TGF-beta desempeña un papel importante en la expresión isotipo IgA cuando las células B se estimulan con LPS, causando un aumento pequeño, pero significativo, de IgA de superficie (sIgA) y un aumento muy definido en la secreción de IgA; estos efectos son mejorado por acción de la IL-2 e IL-5 (Ehrhardt et al, 1992). En el caso de la estimulación de las células B con otro estimulante mitógeno independiente del timo tipo II y IgD anti-dextrano, la TGF-beta condujo a un pequeño aumento similar en la expresión de sIgA, pero causó supresión de la secreción de IgA. La TGF-beta a dosis bajas (0,1 ng / ml) no aumentó significativamente la secreción de IgA y, en dosis más altas (1,0 ng / ml) causa supresión significativa de la secreción de IgA. La adición de diversas citoquinas (IL-2, -4, -5) distintos de TGF-beta a las células B estimuladas no aumentó la expresión de sIgA, pero dio lugar a un aumento de la secreción de cantidades de IgA. La TGF-beta provoca un aumento constante, pero pequeño de sIgA en células B cultivadas y estimuladas por una variedad de estímulos de células T-dependientes o independientes. En contraste, TGF-beta, ya sea promueve o inhibe la supervivencia de células B y la secreción de IgA, dependiendo del método de activación de las células B. Estos resultados son más consistentes con la opinión de que el TGF-beta proporciona sólo una señal parcial o incompleta del interruptor de IgA pero que los factores adicionales están involucrados en el cambio de isotipo IgA y la diferenciación (Munger et al, 1997; Cazac y Roes, 2000).

2.6. Inmunidad de mucosas

Los organismos superiores están expuestos constantemente a microorganismos del medioambiente en el cual se desarrollan, por lo tanto, están en una constante amenaza; así el sistema inmune es el medio para hacer frente a las infecciones por microorganismos (Mayer, 2003). La principal puerta de entrada para los microorganismos son las superficies corporales como la piel y las superficies mucosas (Shanahan, 2000). En ese sentido, el tracto intestinal se conforma como una de las principales puertas de entrada para los microorganismos potencialmente patógenos. Por

lo tanto, se ha desarrollado un complejo sistema de defensa de mucosas intestinal. Sin embargo, es necesario que esta respuesta no sea exagerada, estableciéndose un grado de tolerancia inmunológica importante hacia microorganismos residentes normales, como la flora normal en el tracto intestinal (Liu y Lefrançois, 2004; Kaiserlian et al., 2005; Pabst et al., 2007). Al igual que en el sistema inmune sistémico, el sistema inmune de mucosas comprende al sistema inmune innato, el cual comprende las secreciones biliares, enzimas proteolíticas, péptidos antimicrobianos, etc. De esta forma, gran cantidad de patógenos son neutralizados y eliminados a través de las heces.

El sistema inmune innato es la primera barrera de defensa que tienen que atravesar los microorganismos invasores cuando penetran el organismo (Kamysz et al., 2003). En contraste a la inmunidad adquirida, el sistema inmune innato posee una protección relativa no específica pero inmediata contra patógenos invasores que no genera memoria inmunológica (Phadke et al., 2005). El tracto intestinal posee diversas armas fisicoquímicas de protección innata para la invasión microbiana, que incluyen los movimientos peristálticos, la secreción de mucus, sales biliares, enzimas digestivas y proteínas secretadas; y armas celulares, como las células epiteliales, dendríticas, polimorfonucleares, etc. (Oppenheim et al., 2003).

El mucus en la superficie apical y compuesta de productos secretados por el epitelio, juega un rol esencial en la protección de la mucosa intestinal (Podolski, 1999), unidas a las secreciones biliares y pancreáticas son parte del complejo fisicoquímico de defensa intestinal (Yuan y Walker, 2004), ya que los potenciales patógenos son atrapados en el mucus y son eliminados por los movimientos peristálticos del intestino (Mayer, 2003).

Las uniones estrechas son un mecanismo importante en la defensa de la capa epitelial intestinal, ya que previenen el pasaje de antígenos a la capa subyacente (Podolski, 1999; Mayer, 2003). Dentro de los componentes estructurales de las uniones estrechas se encuentran: ocludinas, cingulinas, zónula ocludens y otras proteínas; sin embargo, el conocimiento de los factores reguladores de las uniones estrechas es incompleto y se requieren mayores estudios (Podolski, 1999).

La superficie epitelial representa una barrera física importante en las superficies mucosas, formando no sólo parte de la respuesta inmune inespecífica sino también parte de la respuesta inmune adaptativa. Las células epiteliales poseen moléculas receptoras en su superficie, éstas moléculas glicoproteicas conocidas como receptores de reconocimiento de patrón (PRR) tienen como función unirse a estructuras altamente antigénicas de los microorganismos patógenos e iniciar una respuesta frente a éstos (Liu y Lefrançois, 2004).

El tracto intestinal se encuentra repleto de folículos organizados y elementos linfoides sensibilizados y no sensibilizados como linfocitos B, T, células plasmáticas y otros tipos celulares junto con los anticuerpos, que están envueltos en la inducción y mantenimiento de la respuesta inmune de mucosas (Ogra et al., 2001), los cuales se constituyen como mecanismos altamente específicos. La respuesta de anticuerpos en las superficies mucosas y en el tracto intestinal se basa en la expresión de inmunoglobulina A secretoria (sIgA), una estructura dimérica de la forma IgA producido por las células B activadas en la superficie epitelial, y que se encuentran unidas gracias al componente secretor que es parte del receptor polimérico localizado en las células epiteliales y que permite la transcitosis del polímero de IgA a través de las células epiteliales. Una vez en la superficie luminal, la sIgA se une a los potenciales antígenos, siendo eliminados por exclusión inmune (Favre et al., 2005).

Un sin número de estudios han revelado que el principal rol de las citoquinas expresadas en el tracto intestinal para el montaje de la respuesta de células Th, es la expresión y secreción de sIgA. Así muchos protocolos de vacunaciones orales promueven la expresión de citoquinas de mucosas tipo Th1 y Th2, para la expresión de sIgA (Bokaya et al., 1999). Los mecanismos de respuesta intestinal no se encuentran completamente entendidos; sin embargo, se ha determinado que el perfil de citoquinas, sea Th1 o Th2, dependerá de la naturaleza del antígeno, de su procesamiento y presentación. Las citoquinas en la superficie mucosa intestinal juegan un rol primordial en la señalización bidireccional. La característica de la inflamación intestinal es la disrupción de la barrera epitelial. En relación a esto es importante mencionar que el balance entre las citoquinas proinflamatorias e inflamatorias es crítico en el mantenimiento del homeostasis intestinal (Perdue, 1999).

Luego de la presentación antigénica, las células Th nativas son diferenciadas hacia los dos tipos de células T colaboradoras, las Th1 eminentemente para la activación de macrófagos; y las Th2 para la respuesta humoral mediada por anticuerpos. Esta diferenciación está guiada por la activación de factores transcripcionales como STAT-6, GATA-3, c-maf, JunB involucrados en la activación Th2; y STAT-1 y STAT-4 involucrados en la expresión de citoquinas Th1 (Weigmann y Neurath, 2002). Se han determinado las citoquinas claves para la generación de diferentes subgrupos de células T, encontrando que IL-12 e IL-4 son claves para la inducción de respuesta de tipo 1 y tipo 2, respectivamente (Hoft y Eickhoff, 2005).

2.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En 1983 Kary Mullis conceptualizó las más importantes de las reacciones biotecnológicas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es un procedimiento que permite a los investigadores copiar y amplificar segmentos específicos de ADN, millones de veces, permitiendo así manipular ADN fácilmente (Valasek y Repa, 2005), utilizando para esto segmentos de nucleótidos llamados iniciadores o cebadores, los cuales son complementarios con la secuencia de nucleótidos de los extremos opuestos de las cadenas que flanquean a dicha secuencia, a los cuales a partir de una ADN polimerasa (generalmente Taq polimerasa), se inicia la elongación y síntesis de nuevas cadenas en el extremo 3' de cada iniciador (Pinilla et al., 2008).

La PCR es una técnica de biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades ínfimas de un ADN específico, posibilitando su fácil identificación (Gibson et al., 2008). Existen variantes de PCR como es el PCR en tiempo real, el cual permite la medición de la amplificación conforme se van realizando los ciclos de la reacción, para esto se emplean fluoróforos que emiten fluorescencia (ej. Agentes intercalantes, sondas de hibridización, etc.), la cual es directamente proporcional al ADN amplificado (Bustin, 2000; Costa, 2004).

2.7.1. Pasos

Básicamente, la reacción en cadena de la polimerasa consta de 3 pasos o etapas: Desnaturalización, alineamiento o hibridación y extensión.

2.7.1.1. Desnaturalización

En esta primera etapa, el ADN es incubado a alta temperatura entre 94 y 95°C por un minuto. Esta temperatura busca romper los enlaces puentes de hidrógeno que une las dos hebras de ADN, separando ambas cadenas y permitiendo así, exponer las bases nitrogenadas del ADN blanco, para permitir la unión de los cebadores en el siguiente paso. Algunos investigadores recomiendan un paso de desnaturalización previa (95°C por 5 a 10 minutos) a los ciclos de amplificación para asegurar la completa separación de todas las cadenas de ADN (Torres y Baca, 1995).

2.7.1.2. Alineamiento (annealing) o hibridación

En este paso ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas con los cebadores o iniciadores, pequeños oligonucleótidos (entre 18 a 22 oligonucleótidos) a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas de ambas clases de ADN. Esta temperatura depende de la temperatura de fusión de los cebadores, la cual está determinada por diversos factores (porcentaje de guanina: citosina, longitud del cavidador, etc), pero que generalmente fluctúa entre 50 y 60°C, y debe optimizarse para cada set de cebadores a usar, ya que es un factor crítico para determinar la especificidad de la prueba, a mayor temperatura los cebadores no hibridarán y a menor temperatura se unirán inespecíficamente (Rodríguez y Barreda, 2004).

2.7.1.3. Extensión

El tercer paso se realiza generalmente entre 72 y 74°C, temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los cebadores en la dirección 5' a 3', añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde. El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación, debiendo estimar 1 minuto para alargar 1000 nucleótidos. Es común que al finalizar todos los ciclos se realice un alargamiento a 72°C por 5 minutos para

asegurar que todos los productos de amplificación estén completamente terminados y tengan por ende la misma longitud (Rodríguez y Barreda, 2004).

2.7.2. Componentes de la PCR

Los componentes de la PCR son los siguientes:

2.7.2.1. Muestra (ADN)

El tipo de muestra puede ser ADN de diversas fuentes: animal, vegetal, bacterial o viral. Las moléculas de ARN, sean de origen viral o ARN mensajeros celulares, pueden servir como molde para amplificación solo después de su conversión en moléculas de ADN complementarias (ADNc) a través de un paso de transcripción reversa.

2.7.2.2. Cebadores o iniciadores (primers)

También denominados primers u oligonucleótidos, tienen una longitud entre 18 a 22 nucleótidos, y aproximadamente 50 a 60% de contenido G+C. Se debe tener en cuenta que los cebadores sean complementarios entre sí, para evitar la formación de dímeros de cebadores. La temperatura de disociación debe ser similar para ambos cebadores debe ser similar (Valasek y Repa, 2005).

2.7.2.3. Cloruro de magnesio

El cloruro de magnesio es un cofactor esencial de la ADN polimerasa usada en PCR y su concentración siempre debe ser optimizada. La presencia de agentes quelantes en la reacción afectan la concentración de iones de Mg^{2+} . Es por eso que la concentración total de magnesio debe exceder la de los dNTPs en la reacción (Valasek y Repa, 2005).

2.7.2.4. Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs)

Los cuatro dNTPs (dTTP, dATP, dGTP y dCTP), son las unidades básicas con los cuales se forman las nuevas cadenas de ADN, y deben encontrarse en la misma concentración (Rodríguez y Barreda, 2004).

2.7.2.5. Enzima

La enzima que cataliza la reacción de PCR es una ADN polimerasa dependiente de ADN. Las más comúnmente usadas son la polimerasa del *Termus aquaticus* (Taq polimerasa) y la del *Termus brockianus* (Tbr polimerasa).

2.8. PCR con transcripción reversa en tiempo real (qRT-PCR)

RT-PCR en tiempo real es un método *in vitro* para amplificar enzimáticamente secuencias definidas de ARN permitiendo además su análisis (Bustin, 2000) y accediendo así a datos fiables y precisos sobre la expresión genética (detección de ARNm) de las células en estudio (Vinueza-Burgos, 2009). PCR en tiempo real amplifica una secuencia diana específica en una muestra y monitorea el progreso de la amplificación mediante la tecnología fluorescente. Durante la amplificación, la rapidez con que la señal fluorescente llegue al nivel umbral se correlaciona con la cantidad de secuencia diana original, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado (Costa, 2004; Nolan et al., 2006), permitiendo esto la cuantificación. Además, el producto final puede ser caracterizado al someterlo a temperaturas ascendentes para determinar cuando el producto de doble cadena se disocia. Este punto de disociación o temperatura de melting (T_m) es una propiedad única que depende de la longitud del producto y su composición de nucleótidos (Valasek y Repa, 2005). En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. (Costa, 2004) eliminando la necesidad de manipulación posterior a la ampliación y reduciendo significativamente el riesgo de contaminación. (Nolan et al., 2006).

En conclusión, la RT-PCR en tiempo real es una combinación de tres pasos: la conversión de ARN en ADNc dependiente de la transcriptasa reversa (RT), la amplificación del cDNA utilizando la PCR y la detección y cuantificación de los productos de amplificación en tiempo real (Nolan et al., 2006).

Bajo condiciones apropiadas de reacción, la cantidad relativa de un determinado cADN generado por transcripción reversa es proporcional a la cantidad relativa de su plantilla de ARN. Si este no fuera el caso, las mediciones de las cantidades de cADN no tendría relevancia para la cuantificación del ARN (Valasek y Repa, 2005; Vinueza-Burgos, 2009).

2.8.1. Componentes de la qRT-PCR

2.8.1.1. Aislamiento de ARN

Un requisito previo al RT-PCR es realizar un método eficiente para la extracción de ARN (Deng, 2005, Espy, 2006). Para obtener resultados cuantitativos fiables, el ARN extraído debe cumplir con ciertos criterios: a) no estar degradado, b) estar libre de ADN genómico, c) estar libre de inhibidores de la RT y d) estar libre de nucleasas para un almacenamiento prolongado (Espy, 2006). El ARN es una molécula mucho menos estable que el ADN y es mejor que sea aislada cuando se le necesite. Se debe evitar la contaminación con RNasas durante su preparación y almacenamiento (Santella, 2006). El ARN es comúnmente extraído mediante el método desarrollado por Chomczynski y Sacchi en 1987. Este método se basa en el uso de tres componentes principales 1) fenol, 2) cloroformo, y 3) una solución caotrópica desnaturizadora (por ejemplo, tiocianato de guanidina o cloruro de guanidina) (Macfarlane y Dahle, 1998).

2.8.1.2. Transcripción reversa

La PCR en tiempo real debe utilizar ADN como secuencia diana, ya que las ADN polimerasas no pueden amplificar ARN de una manera similar. Es así que se requiere el uso de la enzima transcriptasa reversa para generar ADN complementario (cADN) a partir de una plantilla de ARN (Vinueza-Burgos, 2009). Existen diversas transcriptasas reversas comúnmente usadas, entre ellas la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar, la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney y enzimas de ingeniería que mejoran la actividad polimerasa o disminuyen actividades nucleasas no deseadas (Valasek y Repa, 2005).

2.8.2. Marcadores fluorescentes

En la RT-PCR cuantitativa son necesarios elementos ópticos integrados al termociclador y marcadores fluorescentes que proporcionan información acerca de amplificación a lo largo de los ciclos de la PCR (Heid et al., 1996). Existen dos clases principales de marcadores fluorescentes para la PCR en tiempo real: genéricos y específicos.

2.8.2.1. Genéricos

Se basa en la utilización de agentes intercalantes fluorocromos que al unirse a todas las secuencias de doble cadena de ADN en una reacción de PCR emiten una señal fluorescente que se procesa en tiempo real (Walker, 2002). Por lo tanto, un aumento del producto de la PCR conduce a un aumento de la fluorescencia detectada en cada ciclo de la PCR (Ririe et al., 1997). Los más utilizados son los colorantes SYBR® Green y SYBR® Gold (Lee et al., 2004) por su relativo bajo costo (Ririe et al., 1997). La principal limitación de estos marcadores es que al unirse al total de ácidos nucleídos, emiten una señal luminosa tanto para productos específicos como para aquellos que no lo son. Por ello, se realiza un análisis de los resultados en la curva de fusión (Melt Curve) (Ririe et al., 1997), en la que se evalúa la temperatura de fusión (T_m = temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula esta desnaturalizado) ya que cada fragmento amplificado tiene una T_m característica (Costa, 2004).

2.8.2.2. Específicos

Se basa en el empleo de sondas de ácidos nucleídos que se unen a amplicones. Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas (Costa, 2004). Los métodos que utilizan sondas fluorescentes tienen la ventaja de ser muy precisos y evitar posibles artefactos o secuencias inespecíficas presentes en el producto de la PCR. Sin embargo, requiere de un diseño de secuencias específicas para su uso y por consiguiente es más laborioso y costoso (Lee et al., 2004). Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan, las sondas moleculares beacons y las sondas FRET (Costa, 2004).

2.9. Cuantificación relativa

La prueba de PCR en tiempo real, es una poderosa herramienta para cuantificar la expresión de genes (Livak y Schmittgen, 2008). La elección del método de cuantificación depende de la secuencia blanco a analizar, el rango de cantidades esperadas de ARN mensajeros en la muestra de tejido, y si la cuantificación es relativa o absoluta. La cuantificación relativa se basa en la expresión relativa de un gen blanco en comparación a un gen de referencia, que suele ser un gen de expresión constante en los tejidos (“Housekeeping gene”). Para investigar los cambios fisiológicos en la expresión de un gen, la tasa de expresión relativa es adecuada para la mayoría de propósitos (Pfaffl M, 2001). La cuantificación absoluta, se basa en el análisis con una curva de calibración externa o interna, así la metodología debe ser altamente validada, y las eficiencias en la amplificación de ADNc de las muestras y de los estándares deben ser idénticos. Además, las curvas estándares tienen que ser exactamente cuantificados; exigencias no tan estrictas para el análisis de cuantificación relativa (Schmittgen y Livak, 2008).

La cuantificación relativa se basa en la comparación de los Cts (curvas de amplificación) de dos muestras, en las cuales se busca evaluar la eficacia de un tratamiento, estado sanitario, carga viral, etc. Además, se emplea un gen control interno, el cual posee expresión constitutiva en los diferentes tejidos, ya que participa en vías metabólicas indispensables para la célula u organismo evaluado y cuya expresión no se ve afectada por variables externas. Los más usados son: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), albúmina, actina, tubulina, 18S rRNA (Pfaffl, 2001; Schmittgen y Livak, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

El trabajo experimental del tratamiento de animales con L glutamina y la toma de muestras intestinales se realizó en la estación de Maranganí del IVITA (Cusco, Perú). El estudio de la cuantificación de Citoquinas e interleucinas se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología y Parasitología – sección de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria – Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2. Obtención y procesamiento de muestras

Las unidades experimentales fueron 13 crías aparentemente sanas de 4 a 7 días de edad al inicio del trabajo, 6 dosificadas de L-glutamina y 7 controles no tratados.

Se estudió la expresión de citoquinas que regulan positivamente la producción de IgA en la mucosa intestinal en crías de alpaca a 4 a 7 días de edad agrupados en dos grupos de 7 animales cada uno: Grupo A - tratado con L glutamina y Grupo B - control no tratado. Los animales fueron obtenidos de la Estación Experimental IVITA-Maranganí.

El grupo A tratado recibió una dosis de L-glutamina en la concentración de 3.3mM por Kg de peso vivo en 5mL de PBS entre el día 4 a 7 de edad, vía oral, repitiéndose

una dosis más a los 7 días. El grupo B control, animales entre 4 a 7 días, recibió como dosis 5 ml de PBS como dosis en las mismas fechas que los tratados.

Los animales fueron manejados bajo las normas de bioéticas establecidas siendo, para el sacrificio, previamente sedados con xilacina-ketamina (7.5 mg/kg de peso corporal vía I.M.) y posteriormente eutanasiados con sobredosis de pentobarbital sódico.

Los segmentos intestinales fueron descongelados gradualmente desde -196° C seguido de -70° C, -20° C y a 4° C. Seguidamente, se procedió a realizar el raspado profundo del tejido intestinal mediante hoja de bisturí a 4° C sobre placa Petri estéril. El contenido obtenido del raspado fue lavado 2 veces en PBS 0.15M pH 7.2 y centrifugación (eliminar posibles restos de contenido intestinal inhibidores del PCR) y el pellet final fue resuspendido en 500µl de agua libre de nucleasas y congelado a -70° C hasta la extracción de ARN total.

Por ser el yeyuno la porción más grande del intestino delgado y donde se tiene un mayor número de linfocitos intraepiteliales, se tomaron porciones de 2cm de longitud del segmento medio del yeyuno de forma aséptica. Los segmentos fueron inmediatamente lavados en suero fisiológico al 0.9% estéril para eliminar restos de contenido intestinal potencialmente inhibidores de las técnicas moleculares. Los segmentos se colocaron en crioviales estériles de 2ml de capacidad, rotulados y congelados en nitrógeno líquido (-196°C) para su transporte hacia el laboratorio.

3.3. Extracción de ARN total

Para la extracción del ARN se empleó el reactivo TRIZOL® (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los pellets se incubaron a temperatura ambiente por 3 minutos con el reactivo para luego adicionarles cloroformo frío. Tras centrifugar, se tomó la fase acuosa de la mezcla y el ARN total se precipitó con alcohol isopropílico frío, centrifugado e inmediatamente lavado con Etanol frío al

70%. Finalmente, el ARN se resuspendió en 60µl de agua libre de nucleasas y almacenado a -70° C hasta su uso en el RT-PCR

3.4. Síntesis de ADN complementario por transcripción inversa (RT)

El ARN obtenido en el procedimiento anterior para cada una de las muestras fue tomado como templado para la síntesis de ADNc (ADN complementario) empleando el kit “SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR” (Invitrogen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit emplea la transcriptasa reversa MuLV H⁺ para generar ADNc a partir de moléculas de ARN templado en las muestras y viene proveído de dNTP, hexámeros al azar (0.2µM, concentración final) y sales para optimizar la reacción. Las concentraciones finales de los componentes de la síntesis de ADNc en un volumen final de 20ul por reacción/muestra fueron agregados en el siguiente orden y concentración:

- 2x RT Reaction mix 10 µl x n*
- RT enzyme mix 1 µl x n
- Hexámeros al azar 1 µl x n
- H₂O 6 µl x n

*n= número de muestras a trabajar

Se usaron 18µl del master mix en tubos descartables individuales con tapa incorporada para termociclador de 200µl de capacidad. Seguidamente, se añadió 2µl de ARN templado de cada una de las muestras en los tubos correspondientes de modo que el templado no exceda el 10% del volumen final de reacción. Las muestras se llevaron al termociclador PTC-200 Engine Chromo IV de MJ Research – Biorad (USA) programado con el siguiente protocolo:

- 25° C por 10 minutos,
- 50° C por 30 minutos,

- 85° C por 5 minutos.

Se añadió 2 UI de RNasa H⁺ de *E. coli* (provisto por el kit) a cada pocillo y se incubó a 37° C por 20 minutos para destruir la molécula ARN del híbrido ARN: ADNc. El ADNc obtenido fue congelado a -70° C hasta su uso en la reacción de PCR Tiempo Real.

3.5. PCR tiempo real

Para realizar la técnica de PCR Tiempo Real se usaron los oligonucleótidos correspondiente a la citoquina TGF β , las interleucinas 4, 5, 6 y 10 e IgA (tabla 1) .Se incluyeron oligonucleótidos para la amplificación específica de transcritos de GAPDH (Patil y col., 2004) como gen interno para la normalización de la cuantificación relativa.

Se empleó el ADNc de cada una de las muestras como templado para la reacción de PCR con el kit “SuperScriptTM III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR” (Invitrogen, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La reacción PCR utiliza la polimerasa hot Start Taq Platinum modificada para mayor estabilidad contenida en 2x qPCR Master mix que contiene SYBR Green II, buffer, 5mM de MgCl₂, dNTP mix (0,2 μ M concentración final) y como referencia pasiva se utilizó ROX también provisto por el kit. Los oligonucleótidos fueron diluidos en agua libre de nucleasas para obtener soluciones de trabajo de 10 μ M de forma que su concentración final en la reacción fue de 0.2 μ M en todos los casos. Se prepararon los masters mix mediante la mezcla de sus diferentes componentes en tubos eppendorf de 2ml de capacidad en el siguiente orden y concentración para un volumen final de 20ul por reacción/tubo:

- Sybr green super mix 12.5 μ l x n*
- Primer Forward (10 μ M) 0.5 μ l x n
- Primer Reverse (10 μ M) 0.5 μ l x n
- ROX (1:10) 0.5 μ l x n
- Agua libre de nucleasas 9.0 μ l x n
- cDNA 2.0 μ l

*n = número de muestras a trabajar.

Se añadió 2 µl de ADNc de cada una de las muestras en los pocillos correspondientes, de modo que el templado representa el 10% del volumen final de reacción. Se utilizó el termociclador PTC 200 (Peltier therme cyler) Chromo 4 (detector continuo de fluorescencia) de MJ Research – BioRad (USA) programado según el set de oligonucleótidos empleado:

- 50° C por 2 minutos
- 95°C por 10 minutos
- 45 ciclos de:
 - o 95° C por 15 segundos
 - o 60°C por 60 segundos
 - o Lectura de placa
- Temperatura melting de: 65-95°C, cada 0.3°C, 2 segundos
- Mantener a 14°C

El software empleado para el termociclador y el cabezal Chromo 4 fue el Opticon Monitor 2 v2.0.3. Adicionalmente, las mezclas de los productos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñidos con Bromuro de Etidio y visualizados en un Transiluminador UV (UltraLum, USA) para comprobar su pureza e identidad a través de la comprobación de su longitud en pares base.

Los resultados fueron observados y analizados utilizando el programa Opticon Monitor 2.1. (MJ Research – BioRad).

Tabla 1.- cebadores utilizados en el estudio

gen	Cebador hacia adelante	Cebador Reverso	genbank
GAPDH	ATCACTGCCACCCAGAAGAC	GCACGTCAGATCCACAACAG	XM_006210852.1
IL-4	TCATCAAAACGCTGAACACC	CGCTGAGGTTTCCTGTCAAGT	XM_006212827.1
IL-5	GATAGGCGAYGGGAACCTGA	GCCATCTTYCTCCTCCACAC	XM_006212831.1
IL-6	CCTGGTGATGGCTACTGCTT	ACAGTGCCTCCTTGCTGTTT	XM_006201793.1
IL10	TTACCTGGAGGAGGTGATGC	GGCTTTGTAGACCCCCTTCT	XM_006215461.1
TGF β	GAGGTGATCTYGCCACCATT	GTCCTTGCGGAAGTCAATGT	NM_001290071.1
IgA Exon3	AAGGACGTGCTGGTTCGAT	CCCACCATGCAGGAGTAGTT	AM773729.1

3.6. Cuantificación relativa

Se empleó la técnica $2^{-\Delta\Delta C_t}$ como técnica de cuantificación de la expresión relativa de genes detectables a través de RT-PCR Tiempo Real (Livak y Smittngen, 2001). El método se basa en el análisis comparativo de los Ciclos treshold (C_t) de las muestras a estudiar con el del calibrador (fetos de 11 meses de gestación), comparados con el C_t de un control endógeno (GAPDH). En el caso del calibrador para TGF- β los animales usados deben ser los neonatos y no fetos. Esta aproximación sigue la siguiente fórmula:

$$N = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Donde:

N = Cantidad relativa de ARNm con respecto al calibrador

$\Delta\Delta C_t$ = Diferencia entre el control endógeno y el ARNm a analizar con respecto al calibrador

Los resultados se interpretan como: el gen se ha expresado “x” veces con respecto al calibrador.

3.7. Análisis estadístico

Se empleó la prueba de Shapiro-Wilk para saber si las variables siguen la distribución normal. Las que siguen la distribución normal se trabajaron con la t de student (IgA y TGF- β) y las que no tienen una distribución normal (IL4, IL5, IL6 e IL10) se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney-Wilcoxon para el análisis de significancia entre los grupos (tratados y control).

IV. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los animales no tratados demuestran que en el 100% de crías de alpacas, hay expresión de las citocinas relacionadas a la inmunidad adquirida humoral de la inmunoglobulina A que expresan el exón 3 en su mucosa intestinal (tabla2).

El análisis molecular de la expresión de las interleucinas IL-4, IL-5, IL6 e IL-10 de los animales tratados con glutamina demostraron que no existe diferencias significativas entre las crías de alpacas tratadas con L-glutamina y sus controles (Tabla 2, Figura 4). La citocina TGF- β tuvo una expresión 3 veces más que las crías no tratadas existiendo una diferencia estadísticamente significativa ($P<0.05$). La IL-6 tuvo mayor expresión 6.15 veces más que el calibrador (feto al término) en las crías tratadas con L-glutamina que los controles (1.23 veces), sin embargo, no muestran una diferencia estadísticamente significativa ($P=1$) por el amplio rango de variabilidad obtenidos en los animales tratados (Tabla 2, Figura 4).

Igualmente, el gen de IgA en los animales tratados se expresó 46.21 veces más que el calibrador, mientras que los animales no tratados expresaron solo 3.47 veces más que el calibrador, indicando una diferencia estadísticamente significativa ($P<0.05$) entre los animales tratados con respecto a los no tratados (Tabla 2, Figura 5).

Tabla 2.- cuantificación relativa de la expresión de los genes en estudio en la mucosa yeyunal de crías de alpaca tratadas con L-glutamina

	IL-4 (X±DS)	IL-5 (X±DS)	IL-6 (X±DS)	IL-10 (X±DS)	TGF-β (X±DS)	IgA (X±DS)
Control	7.65±3.96 a	1.07±1.09 a	1.23±1.22 a	0.12±0.07 a	0.61±0.45 a	3.47±4.62 a
Tratados	7.25±4.95 a	1.41±0.88 a	6.15±13.3 a	0.23±0.21 a	1.75±0.87 b	46.21±37.47 b

a,b= la diferencia de letras indican significancia estadística

Figura 4.- cuantificación relativa de las interleucinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y TGFβ en la mucosa intestinal del yeyuno en crías de alpaca tratadas con L-glutamina oral y controles (con PBS)

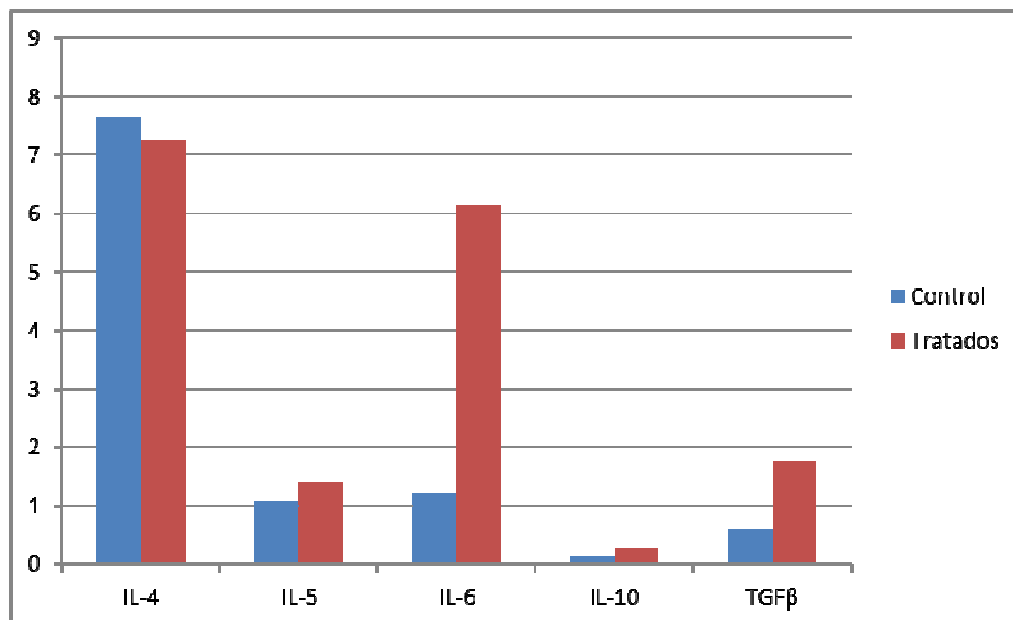
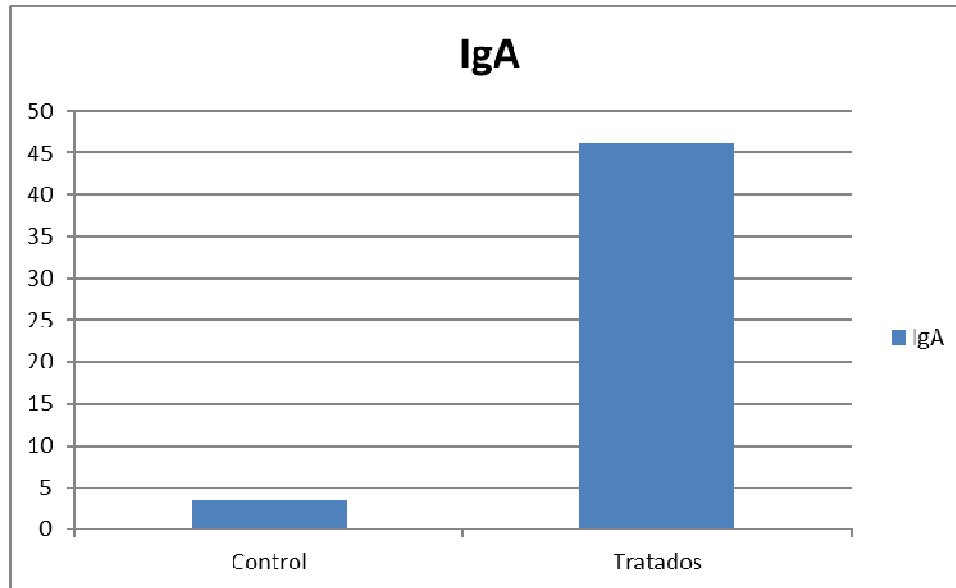


Figura 5.- expresión de IgA en crías de alpaca tratadas con L-glutamina en comparación con los controles



V. DISCUSIÓN

En la actualidad no hay trabajos similares en alpacas, pero si existen estudios en la suplementación de glutamina y glutamato en especies domésticas de granja como en conejo (Chamorro et al, 2009) y el cerdo (Wang et al, 2008; Wu et al, 2011) para evaluar los parámetros productivos y protección contra enfermedades. En este estudio se trataron crías de alpacas con L glutamina en una concentración de 3.3mM por kilo de peso vivo en forma oral, pero a diferencia de estos estudios, solo se le suministró dos veces y en intervalo de 7 días para medir molecularmente los cambios en la expresión de las citoquinas que inducen a una mayor producción de IgA en la mucosa intestinal. La concentración utilizada en nuestro trabajo es mayor a la concentración que se encuentra en el plasma sanguíneo del humano que está en alrededor de 0.7mM y está dentro del rango de una concentración de glutamina intracelular (2-20mM) (Newsholme et al, 2003). Se espera que toda la L glutamina suplementada sea metabolizada en la mucosa intestinal, ya que esta es considerada un tejido consumidor de glutamina (Ramos Lima, et al, 2002).

Si bien es cierto la glutamina es suplementada naturalmente por la leche en las especies mamíferas, en donde tiene mayores concentraciones junto a prolina, metionina, isoleucina y lisina (Davis et al, 1994), las necesidades de este aminoácido son altas durante el estado neonatal por el constante crecimientos del intestino y otros órganos consumidores de glutamina y que los suplementos alimenticios con glutamina mejoran el crecimiento de las crías lactantes (Wang et al, 2008). En este estudio, las dos administraciones de L glutamina suministradas buscan tener disponibilidad inmediata del aminoácido durante la estimulación de la respuesta inmune de la mucosa intestinal,

lo cual se manifiesta con la elevación de la producción de la IgA en el intestino obtenidos, similar a lo que ocurre en ratones que se han suplementado con glutamina en la etapa neonatal (Yu-Ni et al, 2004).

En un estudio en ratones, se determinó que la IL-4 e IL-10 disminuyen cuando son alimentados vía parenteralmente y se mantienen los niveles de expresión de estas interleucinas cuando son suplementados con 2% de L-glutamina, igualmente se mantiene la expresión de IgA (Fukatsu et al., 2001) indicando que la suplementación de L glutamina induce a la expresión de un nivel de citoquinas asociadas a la producción de IgA. En este ensayo en las crías de alpacas la L-glutamina no eleva los niveles de expresión de IL4 e IL10 comparado con los controles debido a que tal vez ya están expresando los niveles adecuados de estas interleucinas ya que la expresión de estas interleucinas son reguladas negativamente por la presencia de interleucinas que promueven la inmunidad de tipo células con un perfil Th1 y está demostrado que en la mucosa intestinal de las crías de alpacas predominan la expresión de las interleucinas de este perfil como el Interferón gamma (INF γ) (Chiok, 2012).

El incremento de IgA en las crías de alpaca tratadas con L-glutamina sin incremento de la IL-4 e IL-10 es controversial ya que estas dos interleucinas participan en la diferenciación y activación de los linfocitos B en células plasmáticas productoras de IgA junto con el Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) en la mucosa intestinal (Fagarasan y Honjo, 2003), el cual si se eleva tres veces más que los animales no suplementados. La función de TGF β parece ser clave para el incremento de IgA en este estudio, ya que el papel del TGF- β indican una función en procesos inmunes e inflamatorios, ya que suprime el crecimiento y diferenciación de muchos linajes de células inmunes, incluyendo células T y B. El TGF- β es producido por todas y cada una de las células de linaje inmunológico y actúa de una manera autocrina y paracrina. Además de la regulación de la proliferación de células del sistema de defensa, regula la expresión de moléculas de adhesión, especialmente en la médula ósea y en el microambiente tímico (Sporn, 1999), además las células T que entran en apoptosis normal son el mayor objetivo del TGF- β , con una acción inmunosupresora drástica, e *in vivo* aumenta las funciones efectoras y de memoria de los linfocitos T CD4⁺ antígeno-específicos, inhibe la secreción de IgG e IgM, pero de manera importante y relevante, el

TGF- β también controla la proliferación y maduración en células B y tiene un papel regulatorio crítico en la expresión de IgA (Moustakas et al, 2002), como parece que produce en este estudio ayudando a incrementar la expresión del gen de la IgA que incluye el exón 3.

Teniendo en cuenta que la L-glutamina es un aminoácido que participa en varios procesos específicos celulares, incluyendo el metabolismo (combustible oxidativo, precursor de la gluconeogénesis, y precursor lipogénico), la integridad celular (apoptosis, la proliferación celular), la síntesis y degradación de proteínas, potencial redox, estallido respiratorio (Curi et al, 2005), debe mejorar la producción de IgA de células plasmáticas ya diferenciadas, debido demostrado al expresarse 18 veces más en comparación a los controles, sin el aumento de la expresión de las citoquinas IL-4 e IL-10). La glutamina es un precursor importante de péptidos y proteínas, así como de aminoazúcares, purinas, pirimidinas al participar en la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos (Boza et al., 2000), facilitando la síntesis de ARNm de los plasmocitos diferenciados y productores de IgA.

La IL-6 está ligeramente elevada en las crías tratadas con L-glutamina. Esta interleucina está asociada a los procesos inflamatorios, sin embargo, en la mucosa intestinal, se ha determinado que los enterocitos y colonocitos producen IL-6 en intestino delgado y grueso, habiendo o no un proceso inflamatorio de por medio, por lo que es necesario mayor investigación en su desempeño en el papel activo en la respuesta inmune del intestino (Jones et al., 1993). La L glutamina eleva el estallido oxidativo de macrófagos y fagocitos (Wu et al., 2004), lo cual podría incrementar la actividad de estas células e incrementar la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-6

La no elevación de las interleucinas IL4, IL5 e IL10 se pueden deber al poco estímulo de la L glutamina por la dosis empleada ya que en un ensayo en cerdos empleando la glutamina como suplemento, se le dio todos los días en el alimento y se demostró su efecto benéfico en la protección contra infecciones de *E coli*, pero no se midieron el nivel de interleucinas asociadas a la respuesta inmune, se esperaría que aumente, aunque su mayor efecto se ha visto principalmente en el mantenimiento de la integridad de la función y morfología intestinal (Yi et al., 2005).

VI. CONCLUSIONES

- 1.- La L glutamina incrementa la expresión del gen del TGF- β en la mucosa intestinal de las crías de alpacas.
- 2.- La L-glutamina mejora la respuesta inmune de mucosa intestinal en crías de alpaca incrementando la producción de IgA.

VII. RECOMENDACIONES

- 1.- Seguir investigando sobre el metabolismo de la L-glutamina en la mucosa intestinal de las crías de alpacas.
- 2.- Investigar más sobre su posible uso como inmunoestimulante asociado a antígenos de patógenos del tracto intestinal de alpacas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2008. Inmunología celular y molecular. 6ª ed. Madrid: Elsevier. 576 p
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2012. Inmunología celular y molecular 7a ed. Madrid: Elsevier. 546 p.
3. Abcouwer SF. 2000. Effects of glutamine on immune cells. *Nutrition*. 16(1): 67-69.
4. Aguirre M, Quintana R, Brandan N. 2002. Citoquinas. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina, Cátedra de Bioquímica. (Internet). Disponible en: <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/citoquinas.pdf>
5. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 124: 783-801.
6. Bardález C, Manchego A, Chiok KL, Sandoval N, More J, Pezo D, Ramirez M. 2013. Cinética de expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 alfa (IL-1 α) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) sanas y con enteropatía. *Rev Inv Vet Perú*. 24(3): 381-389.
7. Berin M, Yang P, Ciok L, Wasserman S, Perdue M. 1999. Role for IL-4 in macromolecular transport across human intestinal epithelium. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 276: C1046-C1052.
8. Bokaya P, Marinaro M, Jackson R, Menon S, Kiyono H, Jirillo E, McGhee J. 1999. IL-12 is an effective adjuvant for induction of mucosal immunity. *J. Immunol.* 162: 122-128.
9. Boza JJ, Moënnoz D, Bournot CE, Blum S, Zbinden I, Finot PA, Ballèvre O. 2000. Role of glutamine on the novo purine nucleotide synthesis in Caco-2 cells. *Eur J Nutr.* 39(1): 38-46.

10. Burmester G., Pezzutto A. 2003. Color Atlas of Immunology. George Thieme Verlag. Stuttgart – Germany. 322 p.
11. Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol. 25: 169-193.
12. Chamorro S, de Blas C, Grant G, Badiola I, Menoyo D, Carabaño R. 2009. Effect of dietary supplementation with glutamine and a combination of glutamine-arginine on intestinal health in twenty-five-day-old weaned rabbits. J Anim Sci. 88(1): 170-180.
13. Chiok K. 2012. Expresión de citoquinas de la respuesta Th1 (IFN- γ , IL-2) y Th2 (IL-4, IL-10) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*) sanas y con enteropatía. Tesis de Magíster en Ciencias Veterinarias. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 88 p.
14. Conjard A, Brun V, Martin M, Baverei G, Ferrier B. 2002. Effect of starvation on glutamine ammoniogenesis and gluconeogenesis in isolated mouse kidney tubules. Biochem J. 368(1): 301-308.
15. Costa J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enferm Infecc Microbiol Clin. 22(5): 299-305.
16. Curi R, Newsholme P, Newsholme EA. 1986. Intracellular distribution of some enzymes of the glutamine utilization pathway in rat lymphocytes. Biochem Biophys Res Commun. 138(1): 318-322.
17. Curi R, Newsholme P, Pithon-Curi TC, Pires-de-Melo M, Homen-de-Bittencourt Júnior PI, Guimarães AR. 1999. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. Braz J Med Biol Res. 32(1): 15-21.
18. Curi R, Lagranha C, Doi S, Sellitti D, Procopio J, Pithon-Curi T, Corless M, Newsholme P. 2005. Molecular mechanisms of glutamine action. J Cell Physiol. 204(2): 392-401.
19. Curthoys NP, Watford M. 1995. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. Annu Rev Nutr. 15: 133-159.
20. Davey E, Greicius G, Thyberg J, Severinson E. 2000. STAT6 is required for the regulation of IL-4 induced cytoskeletal events in B cells. International Immunology. 12(7): 995-1003.

21. Davis TA, Nguyen HV, Garcia-Bravo R, Fiorotto ML, Jackson EM, Reeds PJ. 1994. Amino acid composition of the milk of some mammalian species changes with stage of lactation. *Brit J Nutr.* 72: 845-853. 10.1079/BJN19940089.
22. De Souza HM, Borba-Murad GR, Ceddia RB, Curi R, Vardanega-Peicher M, Bazotte RB. 2001. Rat liver responsiveness to gluconeogenic substrates during insulin-induced hypoglycemia. *Braz J Med Biol Res.* 34(6): 771-777.
23. Deng MY, Wang H, Ward GB, Beckham TR, McKenna TS. 2005. Comparison of six RNA extraction methods for the detection of classical swine fever virus by real-time and conventional reverse transcription-PCR. *J Vet Diagn Invest.* 17(6): 574-578.
24. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 19(1): 165-256.
25. Fagarasan S and T.Honjo. 2003. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defenses. *Nature Reviews Immunology.* 3, 63-72.
26. Favre L, Spertini F, Corthésy B. 2005. Secretory IgA possesses Intrinsic Modulatory Properties Stimulating Mucosal and Systemic Immune Responses. *The Journal of Immunology.* 175: 2793-2800.
27. Fukatsu K, K.A. Kudsk, B.L. Zarzaur, Y. Wu, M.K. Hanna, and R.C. DeWitt. 2001. TPN decreases IL-4 and IL-10 mRNA expression in lipopolysaccharide stimulated intestinal lamina propria cells but glutamine supplementation preserves the expression. *Shock.* 15(4):318-22.
28. Ganz T. 2003. The Role of Antimicrobial Peptides in Innate Immunity. *Integr. Comp. Biol.* 43:300–304.
29. Goldsby R, Kindt T, Kuby J, Osborne B. 2002. *Immunology Fifth Edition.* W H Freeman and Company. 603 p.
30. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6(10): 986-994.
31. Hoft D, Eickhoff C. 2005. Type 1 immunity provides both optimal mucosal and systemic protection against mucosally invasive, intracellular pathogen. *Infect. Immun.* 73(8): 4934-4940.
32. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2001. *Immunobiology: The immune system in health and disease.* Garland Publishing. 5th Edition. 910 p.

33. Janeway C, Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197–216.
34. Jones, S. C., L. K.Trejdosiewicz, , R. E.Banks, P. D. Howdle, A. T. Axon, M. F. Dixon, J. T. Whicher. 1993. Expression of interleukin-6 by intestinal enterocytes. *Journal of Clinical Pathology*, 46(12), 1097–1100.
35. Kadwell M, Fernandez M, Stanley HF, Baldi R, Wheeler JC, Rosadio R, Bruford MW. 2001. Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proc R Soc Lond.* 268: 2575-2584.
36. Kaiserlian D, Cerf-Bensussan N, Hosmalin A. 2005. The mucosal immune system: from control of inflammation to protection against infections. *J. Leukoc. Biol.* 78: 311-318.
37. Kamysz W, Okrój M, Lukasiak J. 2003. Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Bioquímica Polonica.* 50: 461-469.
38. Khogali SE, Pringle SD, Weryk BV, Rennie MJ. 2002. Is glutamine beneficial in ischemic heart disease? *Nutrition* 18(2): 123-126.
39. Kimbrell DA, Beutler B. 2001. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet.* 2(4):256-67.
40. Kowalchuk JM, Curi R, Newsholme EA. 1988. Glutamine metabolism in isolated incubated adipocytes of the rat. *Biochem J.* 249(3): 705-708.
41. Leach M, Davidson N, Fort M, Powre F, Rennie D. 1999. The role of IL-10 in Inflammatory Bowel Disease: “Of Mice and Men”. *Toxicol. Pathol.* 27: 123-133.
42. Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, Carlthaw RW. 2004. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell.* 117(1): 69-81.
43. Li P, Yin YL, Li D, Kim SW, Wu G. 2007. Amino acids and immune function. *Br J Nutr.* 98(2): 237-252.
44. Liu Z, Lefrançois L. 2004. Intestinal Epithelial Antigen Induces Mucosal CD8 T cell Tolerance, Activation and Inflammatory Response. *The Journal of Immunology.* 173: 4324-4330.
45. Macfarlane DE, Dahle CE. 1997. Isolating mRNA from clinical samples with Catrimox-14 and lithium chloride. *J Clin Lab Anal* 11(3): 132-139.
46. Mannon P. 2005. Normal Gut Mucosal Immunity: A dynamic balance of tolerance and defense. *Gastroenterology & Hepatology.* 1(1): 50-51.

47. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I, Asenio M, Márquez J. 2002. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation. *Int J Biochem Cell Biol.* 34(5): 439-458.
48. Matheu V, Barrios Y. 2004. Influencia de la IL-10 en la enfermedad alérgica múrida. *Alergol Inmunol Clin.* 19(2): 61-64.
49. Mayer L. 2003. Mucosal Immunity. *Pediatrics.* 111: 1595-1600.
50. More J, Manchego A, Sandoval N, Ramírez M, Pezo D, Chiok KL, Rivera H. 2011. Detección genómica y expresión de péptidos antimicrobianos (α - y β -defensinas) en mucosa intestinal de crías de alpaca (*Vicugna pacos*). *Rev Inv Vet Perú.* 22(4): 324-335.
51. More J. 2013. Efecto de antígenos clostridiales con ácido retinoico sobre la expresión de citoquinas de la respuesta inmune humoral y celular de la mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis de Magíster en Ciencias Veterinarias. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 104 p.
52. Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin CH. 2002. Mechanism of TGF- β signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett.* 82:85-91.
53. Murphy C, Newsholme P. 1998. Importance of glutamine metabolism in murine macrophages and human monocytes to L-arginine biosynthesis and rates of nitrite or urea production. *Clin Sci (Lond).* 95(4): 397-407.
54. Newsholme P, Curi R, Gordon S, Newsholme EA. 1986. Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. *Biochem J.* 239(1): 121-125.
55. Newsholme P, Lima MM, Procopio J, Pithon-Curi TC, Doi SQ, Bazotte RB, Curi R. 2003a. Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz J Med Biol Res.* 36(2): 153-163.
56. Newsholme P, Procopio J, Lima MM, Pithon-Curi TC, Curi R. 2003b. Glutamine and glutamate-their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct.* 21(1): 1-9.
57. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols.* 1(3): 1559-1582.
58. Odbileg R, Purevtseren B, Batsukh Z, Konnai S, Ohashi K, Onuma M. 2006. Complete cDNA sequences and phylogenetic analysis of the Th1 and Th2

- cytokines of the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). J Vet Med Sci. 68(9): 941-946.
59. Ogra P, Faden H, Welliver R. 2001. Vaccination strategies for mucosal Immune responses. Clin. Microbiol. Rev. 14(2): 430-445.
 60. Oppenheim J, Biragyn A, Kwak L, Yang D. 2003. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. Ann. Rheum. Dis. 62: 17-21.
 61. Pabst O, Bernhardt G, Förster R. 2007. The impact of cell-bound antigen transport on mucosal tolerance induction. J. Leukoc. Biol. 82: 795-800.
 62. Pamer E. 2007. Immune responses to comensal and environmental microbes. Nat. Immunol. 8(11): 1173-1178.
 63. Pasic J, Levy WC, Sullivan MD. 2003. Cytokines in depression and heart failure. Psychosom Med. 65(2):181-93.
 64. Perdue M. 1999. Mucosal Immunity and Inflammation III. The mucosal antigen barrier: cross-talk with mucosal cytokines. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. 277: G1-G5.
 65. Pfaffl, MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nuclei Acids Research. 29(9): 2002-2007.
 66. Phadke S, Deslouches B, Hileman S, Montelaro R, Wiesenfeld H, Mietzner T. 2005. Antimicrobial peptides in Mucosal Secretions: The Importance of Local Secretions in Mitigating Infection. J. Nutr. 135: 1289-1293.
 67. Pithon-Curi TC, Trezena AG, Tavares-Lima W, Curi R. 2002. Evidence that glutamine is involved in neutrophil function. Cell Biochem Funct 20(2): 81-86.
 68. Pithon-Curi TC, Schumacher RI, Freitas JJ, Lagranha C, Newsholme P, Palanch AC, Doi SQ, Curi R. 2003. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. Am J Physiol Cell Physiol. 284(6): C1355- C1361.
 69. Pié S, Lallès JP, Blazy F, Laffitte J, Sève B, Oswald IP. 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. J Nutr. 134(3):641-647
 70. Pinilla G, Cubillos K, Rodríguez M. 2008. Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). NOVA – Publicación científica en ciencias biomédicas 6(9): 65-75.

71. Pithon-Curi TC, Levada AC, Lopes LR, Doi SQ, Curi R. 2002. Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47phox, p22phox and gp91phox in rat neutrophils. *Clin Sci (Lond)* 103(4): 403-408.
72. Podolski D. 1999. Mucosal Immunity and Inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 277: 495-499.
73. Poffenberger M., Jones R. 2014. Amino Acids Fuel T Cell-Mediated Inflammation. *Immunity* 40(15):635-637.
74. Pollard M, Meredith D, McGivan JD. 2002. Identification of a plasma membrane glutamine transporter from the rat hepatoma cell line H4-IIE-C3. *Biochem J.* 368(1): 371-375.
75. Ramos Lima MM, de Mello MA, Curi R. 2002. Walker 256 tumour growth causes marked changes of glutamine metabolism in rat small intestine. *Cell Biochem Funct.* 20(2): 107-113.
76. Rezaei R, Wang W, Wu Z, Dai Z, Wang J, Wu G. 2013. Biochemical and physiological bases for utilization of dietary amino acids by young pigs. *J Anim Sci Biotechnol.* 4(1): 7.
77. Rhoads J, Wu G. 2009. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. *Amino Acids.* 37(1): 111-122.
78. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 245(2): 154-160.
79. Rodríguez IP, Barreda HA. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL.* 7(3): 323-335.
80. Roth E, Oehler R, Manhart N, Exner R, Wessner B, Strasser E, Spittler A. 2002. Regulative potencial of glutamine-relation to glutathione metabolism. *Nutrition.* 18:217-221.
81. Ruth M, Field C. 2013. The immune modifying effects of amino acids on gut-associated lymphoid tissue. *J Anim Sci Biotechnol.* 4(1): 27.
82. Schmittgen T, Livak K. 2008. Analyzing real-time PCR data by comparative Ct method. *Nature Protocols.* 3(6): 1101-1108.
83. Self JT, Spencer TE, Johnson GA, Hu J, Bazer FW, Wu G. 2004. Glutamine synthesis in the developing porcine placenta. *Biol Reprod.* 70(5): 1444-1451.

84. Shanahan F. 2000. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut V. Mechanisms of immunologic sensation of intestinal contents. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 278: G191-196.
85. Skelly RH, Bollheimer LC, Wicksteed BL, Corkey BE, Rhodes CJ. 1998. A distinct difference in the metabolic stimulus-response coupling pathways for regulating proinsulin biosynthesis and insulin secretion that lies at the level of a requirement for fatty acyl moieties. Biochem J. 331(2): 553-561.
86. Spellberg B, Edwards J. 2001. Type 1/Type 2 Immunity in Infectious Diseases. Infectious Diseases Society of America. 32: 76-102.
87. Sporn M. 1999. TGF- β :20 years and counting. Microbes Infect. 1:1251-1253.
88. Staros E. 2005. Innate Immunity: New Approaches to Understanding Its Clinical Significance American Journal of Clinical Pathology. 123: 305-312.
89. Szondy Z, Newsholme EA. 1989. The effect of glutamine concentration on the activity of carbamoyl-phosphate synthase II and on the incorporation of [3H]thymidine into DNA in rat mesenteric lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin. Biochem J. 261(3): 979-983.
90. Szondy Z, Newsholme EA. 1990. The effect of various concentrations of nucleobases, nucleosides or glutamine on the incorporation of [3H] thymidine into DNA in rat mesenteric-lymph-node lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin. Biochem J. 270(2): 437-440.
91. Tambillo L, Manchego A, Chiok KL, Sandoval N, More J, Rivera H. 2013. Evaluación in vitro de la respuesta leucocitaria de alpacas (*Vicugna pacos*) en presencia de antígenos clostridiales. Rev Inv Vet Perú. 24(4): 510-523.
92. Tizard IR. 2002. Introducción a la inmunología veterinaria. 6ta ed. México: McGraw Hill Interamericana. 517 p.
93. Tizard IR. 2009. Introducción a la inmunología veterinaria. 8va ed. Barcelona: Elsevier Saunders. 574 p.
94. Valasek MA, Repa JJ. 2005. The power of real-time PCR. Adv Physiol Educ. 29(3): 151-159.
95. Vinueza-Burgos C. 2009. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. REDVET. (Internet), (Febrero 2009). Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020209.html>

96. Wang J, Chen L, Li P, Li X, Zhou H, Wang F, Li D, Yin Y, Wu G. 2008. Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. *J Nutr.* 138(6): 1025-1032.
97. Watanabe R, Manchego A, Rivera H. 2014. Expresión in vitro de las interleucinas 2 y 10 de linfocitos de alpacas (*Vicugna pacos*) en presencia de antígenos clostridiales. *Rev Inv Vet Perú.* 25(3): 419-429.
98. Weigmann B, Neurath M. 2002. T-bet and mucosal Th1 responses in the gastrointestinal tract. *Gut.* 51: 301-303.
99. Wischmeyer PE, Riehm J, Singleton KD, Ren H, Musch MW, Kahana M, Chang EB. 2003. Glutamine attenuates tumor necrosis factor- α release and enhances heat shock protein 72 in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition.* 19(1): 1-6.
100. Wu G. 1992. Enhanced glutamine and glucose metabolism in cultured rats splenocytes stimulated by phorbol myristate acetate plus ionomycin. *Metabolism.* 41(9): 982-988.
101. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 134(3): 489-492.
102. Wu G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids.* 37(1): 1-17.
103. Wu G, Bazer F, Johnson G, Knabe D, Burghardt R, Spencer T, Li X, Wang J. 2011. Triennial growth symposium: Important roles for L-glutamine in swine nutrition and production. *J anim Sci.* 89(7): 2017-2030.
104. Yagi R, Suzuki W, Seki N, Kohyama M, Inoue T, Arai T, Kubo M. 2002. The IL-4 production capability of different strains of naïve CD4⁺T cells controls the direction of the Th cells response. *International Immunology.* 14(1): 1-11.
105. Yassad A, Husson A, Bion A, Lavoinnie A. 2000. Synthesis of interleukin 1 β and interleukin 6 by stimulated rat peritoneal macrophages: modulation by glutamine. *Cytokine.* 12(8): 1288-1291.
106. Yi G, Carroll J, Allee G, Gaines A, Kendall D, Usry J, Toride Y, Izuru S. 2005. Effect of glutamine and spray-dried plasma on growth performance, small intestinal morphology and immune responses of *Escherichia coli* K88⁺ -challenged weaned pigs. *J Anim Sci.* 83(3): 634-643.

107. Yuan Q, Walker W. 2004. Innate Immunity of the Gut: Mucosal Defense in Health and Disease. *JPGN*. 38: 463-473.
108. Yu-Ni L, Sung-Ling Y, Ming-Tsan L, Huey-Fang S, Chiu-Li Y, Wei-Jao C. 2004. Glutamine supplementation enhances mucosal immunity in rats with Gut-Derived sepsis. *Nutrition*. 20 (3): 286–291.
109. Xin J, Ohmori K, Nishida J, Zhu Y, Huang H. 2007. The initial response of CD4+ IL4 producing cells. *International Immunology*. 19(3): 305-310.
110. Zhong X, Zhang X, Li M, Zhou Y, Li W, Huang X, Zhang L, Wang T. 2011. Intestinal growth and morphology is associated with the increase in heat shock protein 70 expression in weaning piglets through supplementation with glutamine. *J Anim Sci*. 89(11): 3634-3642.

IX. APÉNDICE

Apéndice I.- datos procesados IL-4

IL-4

ID	Edad días	CT1	CT2	CT3	Ct IL-4	Promedio IL-4	Ct GAPDH	Promedio GAPDH	2 ^Δ (- ΔΔCt)	Promedio 2 ^Δ (- ΔΔCt)
----	--------------	-----	-----	-----	---------	------------------	-------------	-------------------	--------------------------------	--

CAL	8y-	feto	40.00	40.00	40.00	40.00	40.00	23.66	23.84	0.89	1.007
	46y	feto	40.00	40.00	40.00	40.00		24.01		1.13	0.17

CONTROL	22y	5	33.3719292	33.371929	33.37203	33.37		18.63		2.68	7.6519 3.96
	30y	7	32.9098854	33.9103317	33.4101	33.41		19.18		3.82	
	32y	7	32.8814507	32.703744	32.792597	32.88		19.13		5.67	
	22y	5	33.3719292	33.371929	33.37203	31.62		19.20	13.41		
	29y	10	33.5981483	31.8093414	32.703744	32.70		19.42		7.37	
	20y	13	31.7960835	31.6226654	31.709374	31.71		18.94		10.50	
	25y	14	31.796083	31.622665	31.709371	31.71		18.93		10.46	

TRATADOS	31y	5	31.440012	31.430813	31.4354125	31.44		18.90		12.37	7.4418						
	12y	9	31.4336834	31.1709633	31.302323							31.30					
	28y	9	33.3986053	32.787323	33.092964								33.09				
	35Y	11	35.490111	35.4880142	35.4890626									35.49			
	13y	14	32.4359703	31.9328403	32.184405										32.18		
	34y	14	32.9617882	32.6246529	32.7943											32.79	
																	19.03
					4.94												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								
										4.53							
											4.53						
												4.53					
					4.53												
						4.53											
							4.53										
								4.53									
									4.53								

Apendice II.- datos procesados IL-5

IL-5

ID	Edad días	CT1	CT2	CT3	Ct IL-5	Promedio IL-5	Ct GAPDH	Promedio GAPDH	2 ^Δ (-ΔΔCt)	Promedio 2 ^Δ (-ΔΔCt)
CAL	8y-feto	35.78	35.07	36.31	35.72	36.07	23.66	23.84	1.13	1.007
	46y-feto	36.89	36.23	36.13	36.42		24.01		0.89	0.17
CONTROL	22y	5	32.8868675	32.6228371	33.25	32.90	18.63		0.24	1.0680 1.09
	30y	7	32.9618683	32.2731018	32.37	32.53	19.18		0.46	
	32y	7	33.7011757	33.7297211	32.92	33.45	19.13		0.24	
	37y	8	32.3583069	32.5995407	32.12	32.36	20.51		1.31	
	29y	10	32.4003181	32.6977386	31.96	32.35	19.42		0.62	
	20y	13	30.5416565	31.1794167	30.73	30.82	18.94		1.28	
	25y	14	34.8887405	33.9591103	34.15	34.33	23.84		3.34	
TRATADOS	31y	5	32.8392792	33.7322121	33.16	33.24	22.63		3.08	1.4092 0.88
	12y	9	31.6736355	30.9466953	30.4	31.01	18.90		1.09	
	28y	9	31.5049229	31.6088982	31.39	31.50	18.62		0.64	
	35y	11	32.8925095	31.6346569	30.96	31.83	19.77		1.13	
	13y	14	31.7290096	31.7290096	30.92	31.46	19.03		0.87	
	34y	14	30.2885818	30.8745918	30.18	30.45	18.93		1.65	

Apéndice III.- datos procesados IL-6

IL-6

			ID	Edad (días)	CT1	CT2	CT3	Ct IL-6	Promedio IL-6	Ct GAPDH	Promedio GAPDH	2 ^{ΔΔCt}	Promedio 2 ^{ΔΔCt}
CAL	8y-15	feto			Undetermined	32.78	Undetermined	32.78	32.18	23.66	23.84	0.58	1.149
	46y-15	feto			31.12	31.93	31.67	31.57		24.01		1.72	0.80
CONTROL	22y	5			30.8917675	33.1126289	32.0031	32.00		18.63		0.03	1.2320 1.22
	30y	7			27.4471645	27.7540455	27.6020	27.60		19.18		0.94	
	32y	7			30.2360668	29.6570854	29.9524	29.95		19.13		0.18	
	37y	8			26.9742413	27.1277905	27.0517	27.05		20.51		3.48	
	29y	10			26.7380562	26.7773743	26.7631	26.76		19.42		2.00	
	20y	13			28.3391399	28.2483292	28.2921	28.29		18.94		0.49	
	25y	14			31.6740189	31.5330601	31.6014	31.60		23.84		1.49	
TRATADOS	31y	5			25.9362183	25.8893738	25.9103	25.91		22.63		33.33	6.1540 13.32
	12y	9			28.2273273	28.4280701	28.3321	28.33		18.90		0.47	
	28y	9			26.8364944	27.4667778	27.1531	27.15		18.62		0.88	
	35y	11			29.3497143	30.0094852	29.6840	29.68		19.77		0.34	
	13y	14			27.5554924	27.7975712	27.6811	27.68		19.03		0.81	
	34y	14			27.1652622	27.112402	27.1402	27.14		18.93		1.10	

Apéndice IV.- datos procesados IL-10

IL- 10

ID			Edad (días)	CT1	CT2	CT3	Ct IL-10	Promedio IL-10	Ct GAPDH	Promedio GAPDH	2 ⁻ (-ΔΔCt)	Promedio 2 ⁻ (-ΔΔCt)
CAL	8y	feto		25.56	26.29	25.67	25.84	25.82	23.66	23.84	0.87	1.010
	46y	feto		25.90	25.89	25.58	25.79		24.01		1.15	0.20
CONTROL	22y	5	26.2656918	25.02	25.35	25.55			18.63		0.03	0.1149
	30y	7	23.812521	23.32	23.46	23.53			19.18		0.19	
	32y	7	26.184988	24.59	24.5	25.09			19.13		0.06	
	37y	8	26.4758911	25.98	25.73	26.06			20.51		0.08	0.07
	29y	10	24.6256676	24.39	24.72	24.58			19.42		0.11	
	20y	13	24.5807343	24.3	24.29	24.39			18.94		0.09	
	25y	14	28.9248657	27.22	27.66	27.93			23.84		0.23	
TRATADOS	31y	5	26.0191174	25.01	25.23	25.42			22.63		0.57	0.2301
	12y	9	24.9140511	24.65	24.95	24.84			18.90		0.06	
	28y	9	26.3182926	25.48	25.67	25.82			18.62		0.03	
	35y	11	23.9262371	22.85	22.92	23.23			19.77		0.36	0.21
	13y	14	24.9341927	24.13	24.32	24.46			19.03		0.09	
	34y	14	23.5278149	22.81	22.09	22.81			18.93		0.27	

Apéndice V.- datos procesados TGF-β

TGF-β

	ID	Edad días	CT1	CT2	CT3	Ct TGF-β	Promedio TGF-β	Ct GAPDH	Promedio GAPDH	2 ^{ΔΔCt}	Promedio 2 ^{ΔΔCt}
C A L	8y-15	feto	27.77 43168	27.5512 581		27.6 6	27.63	22.26	22.49	0.83	1.0171
	46y-15	feto	27.45 12691	27.6601 505	27.68	27.6 0		22.73		1.20	0.26
CONTROL	22y	5	24.58 65459	24.5240 479	24.5 59	24.5 6		17.45		0.26	0.6094 0.46
	30y	7	23.81 08788	23.9730 587	23.91 0	23.8 9		17.84		0.53	
	32y	7	23.41 73698	23.6155 853	23.51 9	23.5 2		17.88		0.71	
	37y	8	23.87 94422	23.8286 171	23.87 1	23.8 5		19.36		1.56	
	29y	10	23.99 87144	23.9719 543	23.95 8	23.9 9		18.18		0.63	
	20y	13	24.61 50818	24.6350 212	24.63 2	24.6 3		17.70		0.29	
	25y	14	24.61 51232	24.6163 42	24.6 18	24.6 2		17.70		0.29	
TRATADOS	31y	5	23.69 0000	23.6900 00	23.7 01	23.6 9		19.00		1.36	1.7528 0.87
	12y	9	23.68 88084	23.7009 964	23.69 2	23.6 9		19.70		2.21	
	28y	9	24.70 28961	24.7000 00	24.71 1	24.7 0		19.77		1.15	
	35y	11	23.91 50085	23.9637 108	23.94 3	23.9 4		19.00		1.15	
	13y	14	24.52 0000	24.5217 056	24.52 0	24.5 2		19.77		1.31	
	34y	14	23.10 40325	23.1000 00	23.1 02	23.1 0		19.70		3.33	

Apéndice VI.- datos procesados IgA

IgA

			ID	Edad (días)	CT1	CT2	CT3	Ct IgA	Promedio IgA	Ct GAPDH	Promedio GAPDH	2 ⁻ (-ΔΔCt)	Promedio 2 ⁻ (-ΔΔCt)
CAL	8y-15	feto			31.79	32.99	33.62	32.80	32.24	23.66	23.84	0.60	1.132
	46y-15	feto			31.54	31.76	31.75	31.68		24.01		1.66	0.75
CONTROL	22y	5			28.4184113	29.014860	28.689	28.72		18.63		0.31	
	30y	7			26.1811237	26.585878	26.276	26.38		19.18		2.30	
	32y	7			30.4721336	29.742410	30.123	30.11		19.13		0.17	3.4707
	37y	8			26.8590488	26.917793	26.901	26.89		20.51		4.08	4.62
	29y	10			24.1720047	23.966985	24.108	24.07		19.42		13.51	
	20Y	13			31.556401	30.969495	31.258	31.26		23.83		1.96	
	25y	14			31.5674896	30.970396	31.282	31.27		23.84		1.96	
TRATADOS	12y2	9			21.672	22.66372	22.172	22.17		18.89		34.98	
	12y	9			21.9821663	22.3634796	22.181	22.17		18.90		35.00	
	28y	9			25.6131878	25.5545712	25.579	25.58		18.62		2.71	46.2098
	35y	11			20.747509	20.8246002	20.801	20.79		18.77		83.85	37.47
	13y	14			22.9705315	22.8220234	22.922	22.90		18.90		21.25	
	34y	14			20.7816734	20.6264131	20.699	20.70		18.93		99.47	

Anexo 1. Estadística IL-4



The screenshot displays the Stata/SE 12.0 software interface. The top menu bar includes File, Edit, Data, Graphics, Statistics, User, Window, and Help. Below the menu is a toolbar with various icons for file operations and analysis. The main window is divided into two panes. The left pane shows a list of commands being executed, with some highlighted in blue. The right pane shows the output of these commands.

Command Window Output:

```
. label values Tratamiento tratamiento
```

```
. save "C:\Users\ZYDAN\Desktop\IL-5.dta"
```

file C:\Users\ZYDAN\Desktop\IL-5.dta saved

```
. swilk IL_5
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
IL_5	13	0.83446	2.916	2.096	0.01803

```
. ranksum IL_5, by(Tratamiento)
```

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

Tratamiento	obs	rank sum	expected
control	7	42	49
tratados	6	49	42
combined	13	91	91

unadjusted variance 49.00
adjustment for ties -0.13

adjusted variance 48.87

```
Ho: IL_5(Tratam~o==control) = IL_5(Tratam~o==tratados)
```

$z = -1.001$
 $\text{Prob} > |z| = 0.3166$

.

Command

C:\Users\ZYDAN\Documents\JOAN\Fincyt\STATA 12

Stata/SE 12.0 - C:\Users\ZYDAN\Desktop\IL-6.dta - [Results]

File Edit Data Graphics Statistics User Window Help

Revi... Y 4 X

Com... _ ^

1.. repla...
1.. repla...
2.. repla...
2.. repla...
2.. set o...
2.. repla...
2.. set o...
2.. repla...
2.. set o...
2.. repla...
2.. set o...
2.. repla...
3.. set o...
3.. repla...
3.. set o...
3.. repla...
3.. repla...
3.. repla...
3.. repla...
3.. repla...
4.. rena...
4.. rena...
4.. label ...
4.. label ...
4.. save "...
4.. swilk ...
4.. ranks...

```
. label values Tratamiento tratamiento

. save "C:\Users\ZYDAN\Desktop\IL-6.dta"
file C:\Users\ZYDAN\Desktop\IL-6.dta saved

. swilk IL_6

                Shapiro-Wilk W test for normal data

+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
| Variable | Obs | W      | V      | z      | Prob>z |
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
| IL_6     | 13  | 0.39401 | 10.674 | 4.638  | 0.00000 |
+-----+-----+-----+-----+-----+

. ranksum IL_6, by(Tratamiento)

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

+-----+-----+-----+-----+
| Tratamiento | obs | rank sum | expected |
+-----+-----+-----+-----+
| control     | 7   | 49        | 49        |
| tratados    | 6   | 42        | 42        |
+-----+-----+-----+-----+
| combined    | 13  | 91        | 91        |
+-----+-----+-----+-----+

unadjusted variance      49.00
adjustment for ties      -0.00
+-----+
adjusted variance        49.00

Ho: IL_6(Tratam~o==control) = IL_6(Tratam~o==tratados)
      z =      0.000
    Prob > |z| =      1.0000

.
```

Command

C:\Users\ZYDAN\Documents\JOAN\Fincyt\STATA 12

Stata/SE 12.0 - C:\Users\ZYDAN\Desktop\IL-10.dta - [Results]

File Edit Data Graphics Statistics User Window Help

Revi... Y 4 X

Com... _ ^

```

1.. repla... . label values Tratamiento tratamiento
1.. repla... . save "C:\Users\ZYDAN\Desktop\IL-10.dta"
file C:\Users\ZYDAN\Desktop\IL-10.dta saved
2.. repla... . swilk IL_10
2.. repla...
2.. set o... Shapiro-Wilk W test for normal data
2.. repla...
2.. set o...
2.. repla...
2.. set o...
2.. repla...
2.. set o...
2.. repla...
3.. set o...
3.. repla...
3.. set o...
3.. repla...
3.. repla...
3.. repla...
3.. repla...
3.. repla...
3.. repla...
4.. rena...
4.. rena...
4.. label ...
4.. label ...
4.. save "...
4.. swilk ...
4.. ranks...

```

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
IL_10	13	0.81572	3.246	2.306	0.01054

```

. ranksum IL_10, by(Tratamiento)
Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

```

Tratamiento	obs	rank sum	expected
control	7	43.5	49
tratados	6	47.5	42
combined	13	91	91

```

unadjusted variance      49.00
adjustment for ties      -0.40
-----
adjusted variance        48.60

```

```

Ho: IL_10(Tratam~o==control) = IL_10(Tratam~o==tratados)
      z =  -0.789
      Prob > |z| =  0.4301
.

```

Command

C:\Users\ZYDAN\Documents\JOAN\Fincyrt\STATA 12

Stata/SE 12.0 - C:\Users\ZYDAN\Desktop\IgA.dta - [Results]

File Edit Data Graphics Statistics User Window Help

Revi... Y 4 X

Com... _ ^

1.. repla...
1.. repla...
2.. repla...
2.. repla...
2.. set o...
2.. repla...
2.. set o...
2.. repla...
2.. set o...
2.. repla...
2.. set o...
3.. set o...
3.. repla...
3.. set o...
3.. repla...
3.. repla...
3.. repla...
3.. repla...
3.. repla...
4.. rena...
4.. rena...
4.. label ...
4.. label ...
4.. save "...
4.. swilk ...
4.. ranks...

```
. label values Tratamiento tratamiento

. save "C:\Users\ZYDAN\Desktop\IgA.dta"
file C:\Users\ZYDAN\Desktop\IgA.dta saved

. swilk IgA

                Shapiro-Wilk W test for normal data

+-----+-----+-----+-----+-----+
| Variable | Obs | W      | V      | z      | Prob>z |
+-----+-----+-----+-----+-----+
| IgA      | 13  | 0.72675 | 4.813  | 3.078  | 0.00104 |
+-----+-----+-----+-----+

. ranksum IgA, by(Tratamiento)

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

+-----+-----+-----+
| Tratamiento | obs | rank sum | expected |
+-----+-----+-----+
| control     | 7   | 30       | 49        |
| tratados    | 6   | 61       | 42        |
+-----+-----+-----+
| combined    | 13  | 91       | 91        |
+-----+-----+-----+

unadjusted variance      49.00
adjustment for ties      -0.13
+-----+
adjusted variance        48.87

Ho: IgA(Tratam~o==control) = IgA(Tratam~o==tratados)
      z = -2.718
      Prob > |z| = 0.0066

.
```

Command

C:\Users\ZYDAN\Documents\JOAN\Fincyt\STATA 12

Anexo 6. Estadística TGF- β

Stata/SE 12.0 - C:\Users\ZYDAN\Desktop\TGF-b.dta - [Results]

File Edit Data Graphics Statistics User Window Help

Revi... T F X

Com... ^

1.. repla...
2.. repla...
2.. repla...
2.. repla...
2.. set o...
2.. repla...
2.. set o...
2.. repla...
2.. set o...
2.. repla...
2.. set o...
3.. repla...
3.. set o...
3.. repla...
3.. set o...
3.. repla...
3.. repla...
3.. repla...
3.. repla...
3.. repla...
3.. repla...
4.. repla...
4.. rena...
4.. rena...
4.. label ...
4.. label ...
4.. save "...
4.. swilk ...
4.. ttest ...

```
. label define tratamiento 0 "control" 1 "tratados"

. label values Tratamiento tratamiento

. save "C:\Users\ZYDAN\Desktop\TGF-b.dta"
file C:\Users\ZYDAN\Desktop\TGF-b.dta saved

. swilk TGF_b
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
TGF_b	13	0.87180	2.258	1.596	0.05528

```
. ttest TGF_b, by(Tratamiento)
```

Two-sample t test with equal variances

Group	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]
control	7	.61	.1722816	.4558143	.1884421 1.031558
tratados	6	1.751667	.3546681	.8687558	.8399633 2.66337
combined	13	1.136923	.2432588	.8770821	.6069076 1.666938
diff		-1.141667	.3758502		-1.968907 -.3144259

```
diff = mean(control) - mean(tratados)          t = -3.0376
Ho: diff = 0                                degrees of freedom = 11

Ha: diff < 0                                Ha: diff != 0                                Ha: diff > 0
Pr(T < t) = 0.0056                        Pr(|T| > |t|) = 0.0113                        Pr(T > t) = 0.9944
```

Command

C:\Users\ZYDAN\Documents\JOAN\Fincyt\STATA 12